



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

**SCHALANA OLIVEIRA DOS REIS**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM AÇAÍ  
JUÇARA SOBRE O NÚMERO DE FOCOS DE  
CRIPTAS ABERRANTES E EXPRESSÃO DE  
SOD1 EM RATOS SUBMETIDOS À  
CARCINOGENESE COLORRETAL**

VITÓRIA  
2016

**SCHALANA OLIVEIRA DOS REIS**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM AÇAÍ JUÇARA SOBRE O  
NÚMERO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES E  
EXPRESSÃO DE SOD1 EM RATOS SUBMETIDOS À  
CARCINOGENESE COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia do Centro de  
Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia.  
Orientadora: Profa. Dra. Adriana  
Madeira Álvares da Silva Conforti.

VITÓRIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

R375e      Reis, Schalana Oliveira dos, 1989 -  
              Efeito da suplementação com açaí Juçara sobre o número  
de focos de criptas aberrantes e expressão de SOD1 em ratos  
submetidos à carcinogênese colorretal / Schalana Oliveira dos  
Reis – 2016.  
              60 f. : il.

Orientador: Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Neoplasias Colorretais. 2. Focos de Criptas Aberrantes.  
I. Conforti, Adriana Madeira Álvares da Silva. II. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III.  
Título.

CDU: 61

---

**SCHALANA OLIVEIRA DOS REIS**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM AÇAÍ JUÇARA SOBRE O  
NÚMERO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES E  
EXPRESSÃO DE SOD1 EM RATOS SUBMETIDOS À  
CARCINOGENESE COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 26 de fevereiro de 2016.

---

**Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientadora**

---

**Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes**  
**Universidade de São Paulo**

---

**Prof. Dra. Flávia de Paula**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**

---

**Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira (Suplente)**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**

VITÓRIA

2016

*Aos meus pais, Elisa e Ivandelson (in memoriam), meus exemplos de vida!*

*Ao meu irmão Cleiton, pelo incentivo!*

*Ao meu marido Geovany, por todo amor e apoio!*

*“A persistência é o caminho do êxito”.*

*(Charles Chaplin)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, saúde e coragem para vencer todas as dificuldades, por me abençoar sempre e por ter permitido a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de cursar um mestrado em uma instituição respeitada.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

À professora Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti, minha orientadora, por me acolher e acreditar em mim.

Aos professores Dr. Fábio Daumas, Dra. Flávia de Paula e Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira por terem gentilmente aceitado participar da banca e contribuir com a minha pesquisa.

À Tamires Conceição da Luz, pelas amostras concedidas.

Ao professor Me. Leonardo Oliveira Trivilin pela paciência, pelas aulas particulares, estatística, direcionamento e pelos conselhos. Muito obrigada pela grande contribuição neste trabalho, Sua colaboração foi fundamental.

À querida Suzanny Mendes pela companhia e pela ajuda no laboratório, por dividir seus conhecimentos e por todas as aulas particulares.

Aos amigos do grupo de pesquisa, Gaby, Juliana, Erika, Ester, Camila, Carlos, Aline e Anderson pela convivência, boa companhia e por compartilharem de ótimos momentos no ambiente de trabalho.

Aos amigos de bancada, Letícia, Diego, Joaquim, Mayara, Cinthia, Gabi e Lucas, muito obrigada por toda contribuição e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao amigo Dioener pela ajuda no Photoshop.

As queridas amigas Mi, Erica e Fran por todo o apoio, conselhos, companheirismo e amizade.

Aos meus sogros, Adair e Fátima, por toda ajuda e apoio.

A minha mãe, Elisa, pela confiança, apoio e seus ensinamentos.

Ao meu irmão Cleiton, por confiar em mim e me apoiar sempre nas minhas decisões.

Ao meu marido, Geovany, pelo apoio incondicional, pelos conselhos, por me incentivar a ser melhor a cada dia. Obrigada por ter me dado toda força nos momentos difíceis, pelo amor de todo dia, pelo suporte nos momentos de cansaço e o consolo quando tudo parecia que não ia dar certo.

Por fim, agradeço a todos que acreditaram, torceram, ajudaram e rezaram por mim.

Muito obrigada!

## RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é um dos tipos mais frequentes de câncer no mundo e uma das mais importantes causas de morte no Brasil. É o terceiro tipo de câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres em todo o mundo. A superfície do intestino grosso é revestida por criptas de Lieberkuhn, células absorptivas invaginadas. O CCR é iniciado pelo aparecimento de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) e alterações morfológicas nas criptas de Lieberkuhn. Estudos demonstram que antioxidantes presentes em frutas e vegetais podem contribuir para a prevenção de algumas doenças, como o câncer. Esta ação de prevenção é considerada direta quando o antioxidante atua na eliminação de espécies reativas e indireta, quando induz o aumento da atividade ou expressão das enzimas antioxidantes endógenas, como a SOD1. O açaí Juçara vem se destacando por sua composição rica em compostos antioxidantes, muito importantes na neutralização das espécies reativas. Com intuito de avaliar a ingestão de Juçara no número de FCA e na expressão de SOD1 no CCR, foi realizado estudo com 16 amostras de intestino grosso de ratos submetidos à carcinogênese com a substância 1,2-dimetilhidrazina (DMH). Foram avaliadas a quantidade de FCA, a área e o escore de expressão da SOD1, em ratos suplementados e não suplementados com Juçara. A suplementação com suco de açaí Juçara promoveu menor número de focos de criptas aberrantes na mucosa colorretal de ratos induzidos à carcinogênese. A superóxido dismutase 1 foi expressa na mucosa colorretal de ratos induzidos ou não à carcinogênese. A suplementação com o suco do açaí Juçara resultou na maior expressão e percentual de ocupação da SOD1 em intestino grosso. Assim, o açaí Juçara pode ser um aliado na prevenção do câncer colorretal, visto a redução do número de lesões no epitélio do cólon e o possível auxílio no estímulo à produção de enzimas antioxidantes. Estes resultados abrem perspectivas para o uso do açaí Juçara na suplementação dietética, na elaboração de produtos e medicamentos que favoreçam a prevenção e tratamento do câncer colorretal.

Palavras-chave: Açaí Juçara (*Euterpe edulis* Martius), câncer colorretal, SOD1, Focos de Criptas Aberrantes



## ABSTRACT

Colorectal Cancer (CC) is one of the most frequent cancers in the world and one of the most important causes of death in Brazil. It is the third most common cancer in men and second in women worldwide. The surface of the large intestine is coated by Lieberkuhn crypts, invaginated absorptive cells. CC is initiated by appearance of Aberrant Crypt Foci (ACF) and morphological changes in the crypts of Lieberkuhn. Studies have shown that antioxidants in fruits and vegetables can contribute to the prevention of some diseases, like cancer. This preventive action is considered direct when antioxidant acts on elimination of reactive species and indirect when improves expression or activity of endogenous antioxidant enzymes such as SOD1. The Juçara acai has been highlighted by its rich composition of antioxidants, very important in the neutralization of reactive species. In order to assess the Juçara intake related to the number of ACF and SOD1 expression in CC, a study was conducted on 16 samples of large intestine of rats with carcinogenesis with 1,2-dimethylhydrazine (DMH). It was measured the amount of ACF area and the expression of SOD1 score rats supplemented and non supplemented with Juçara. The supplementation with acai juice Juçara promoted fewer aberrant crypt foci in the colon mucosa of rats induced to carcinogenesis. Superoxide dismutase 1 was expressed in colorectal mucosa of rats induced or not to carcinogenesis. Supplementation with Juçara acai juice resulted in greater expression and SOD1 occupancy percentage in the large intestine. Thus, acai Juçara can be an ally in colorectal cancer prevention, since the reduction in number of lesions in colon epithelium and can aid in stimulating the production of antioxidant enzymes. These results open perspectives for the use of acai Juçara in dietary supplementation, development of products and drugs that promote the prevention and treatment of colorectal cancer.

Keywords: Juçara acai (*Euterpe edulis* Martius), Colorectal cancer, SOD1, Aberrant Crypt Foci

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Progressão da carcinogênese do câncer de cólon.....	17
Figura 2: Estrutura da SOD1, com destaque para o sítio ativo. Os íons de cobre e zinco são respectivamente, as esferas azul e laranja. ....	24
Figura 3: Fotomicrografia de mucosa intestinal de ratos submetidos à carcinogênese colorretal com 1,2-dimetilhidrazina imunopositiva para SOD1. (A): exemplo de escore 1-3 de expressão, (B): exemplo de escore >3 de expressão. IHQ, DAB, Objetiva de 40X.....	35
Figura 4: Captura de tela do programa Photoshop CC 2015® para exemplificar a metodologia utilizada na quantificação do percentual de ocupação da SOD1 (área pontilhada) em mucosa colorretal de ratos. ....	36
Figura 5: Média do consumo de açaí Juçara pelos animais do grupo experimental RCA, após 14 dias de suplementação.....	37
Figura 6: Fotomicrografia de mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina corada com azul de metileno e evidenciação de focos de criptas aberrantes - FCA (seta). A) Grupo experimental suplementado com açaí Juçara e evidenciação de FCA com quatro criptas (50X) B) Grupo experimental não suplementado destacando FCA com nove criptas (50X).. ....	38
Figura 7: (A): Valor total de focos de criptas aberrantes encontrados no intestino grosso dos grupos não suplementados (RSA) e suplementados (RCA). (B): Média de focos de criptas aberrantes encontrados no intestino grosso dos grupos não suplementados (RSA) e suplementados (RCA). As médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste t ( $p < 0,05$ ).....	39
Figura 8: Comparação das médias dos escores de expressão da SOD1 na mucosa colorretal de ratos entre o grupo Controle e os grupos induzidos com (RCA) e sem suplementação (RSA). As médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de ANOVA, post hoc Dunnet ( $p < 0,05$ ). ....	40
Figura 9: Comparação das médias da % de expressão da SOD1 na mucosa colorretal dos ratos do grupo Controle e grupos induzidos com (RCA) e sem suplementação (RSA). As médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de ANOVA, post hoc Dunnet ( $p < 0,05$ ).....	41

## LISTA DE SIGLAS

APC- Adenomatous *polyposis coli*

ARE- Elemento de Resposta Antioxidante (Do inglês Antioxidant Response Element)

CCR – Câncer Colorretal

DAB - 3'3-diamino benzidina

DMH - 1,2-dimetilhidrazina

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FCA - Focos de Criptas Aberrantes

GPx- Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione Redutase

HNPCC - Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose (Do inglês Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer)

Keap1- Do inglês Kelch-like ECH-associated protein 1

Nrf2- Do inglês Nuclear factor E2-Related Factor 2

PAF - Polipose Adenomatosa Familiar

RCA- Ratos com suplementação de Açaí

RSA- Ratos Sem suplementação de Açaí

SOD - Superóxido Dismutase

SOD1 - Superóxido Dismutase 1

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
1.1.	Câncer colorretal	13
1.2.	Radicais Livres	21
1.3.	Superóxido dismutase (SOD)	23
1.4.	Açaí Juçara	25
1.4.1	Antocianinas	27
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO</b>	28
2.1.	Objetivo geral	28
2.2.	Objetivos específicos	28
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	29
3.1.	Aspectos éticos	29
3.2.	Animais e Indução neoplásica	29
3.3.	Polpa de açaí Juçara	30
3.4.	Procedimento experimental	30
3.5.	Contagem dos focos de criptas aberrantes e cortes histológicos	31
3.6.	Imuno-histoquímica	32
3.7.	Análise semi-quantitativa da expressão de SOD1 e obtenção do escore de expressão	34
3.8.	Análise quantitativa da expressão de SOD1	35
3.9.	Análise estatística	36
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	37
4.1.	Consumo do suco de açaí Juçara	37
4.2.	Análise do número de focos de criptas aberrantes - FCA	37
4.3.	Expressão de SOD1 por análise semi-quantitativa	39
4.4.	Expressão de SOD1 por análise quantitativa	40
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	41
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	48
	<b>ANEXO</b>	60

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) é um dos tipos mais frequentes de câncer no mundo e uma das mais importantes causas de morte no Brasil (HUR *et al.*, 2000; MEDRADO-FARIA; ALMEIDA; ZANETTA, 2001). É o terceiro tipo de câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres em todo o mundo (IARC, 2012). No Brasil, a maior incidência de casos ocorre nas regiões Sudeste e Sul, sendo o segundo mais frequente na região Sudeste, com 19.950 casos. Em 2016 são esperados 34.280 casos no país, sendo 16.660 em homens e 17.620 em mulheres (INCA, 2015).

No mundo, a maior incidência de casos é em países desenvolvidos (60%), como Austrália, Nova Zelândia, regiões da Europa e América do Norte (JEMAL *et al.*, 2011). A média global de sobrevida é de 40% para países em desenvolvimento, sendo esse um índice de sobrevida baixo. A idade é considerada um fator de risco, pois a faixa etária de maior incidência situa-se entre os 50 e 70 anos. Entretanto não é raro o surgimento em indivíduos mais jovens, abaixo dos 40 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O câncer colorretal compreende tumores que acometem um segmento do intestino grosso (cólon) e o reto. Na maioria dos casos é curável, se detectado precocemente (INCA, 2015). O tratamento depende do tamanho, localização e extensão do tumor. A cirurgia é o tratamento inicial seguida de radioterapia e/ou quimioterapia (INCA, 2013).

Os fatores genéticos hereditários representam 20% das causas de CCR e as condições hereditárias frequentemente associadas à CCR são a polipose, que inclui a polipose adenomatosa familiar (PAF), a polipose familiar juvenil e a síndrome de Peutz-Jegher; e a não polipose, representado pelo câncer colorretal hereditário não polipose (HNPCC) ou síndrome de Lynch (THORSON; KNEZETIC; LYNCH, 1999).

A PAF é caracterizada pelo surgimento precoce de múltiplos adenomas ou pólipos no cólon. Estes adenomas múltiplos apresentam grande risco de tornar-se maligno

precocemente (JORDE *et al.* 2000). É uma doença autossômica dominante, resultado de uma mutação no gene Adenomatous *polyposis coli* (APC), localizado no cromossomo 5q 21. O portador da mutação no gene APC tem quase 100% de probabilidade de desenvolver câncer do cólon (GRODEN *et al.*, 1991).

A ocorrência da PAF é de 1 em 7000 a 1 em 16000 nascidos vivos , sendo responsável por menos de 1% dos casos de câncer colorretal (BURT *et al.*, 1990).

A polipose juvenil é uma síndrome autossômica dominante rara e pode ser desencadeada por mutações no gene SMAD4/DPC4 (codifica um sinalizador intermediário de TGF- $\beta$ ) (HAMILTON; AALTONEN, 2000). É caracterizada pelo aparecimento de 10 ou mais pólipos juvenis (lesões hamartomatosas focais do epitélio mucoso e da lâmina própria no trato gastrintestinal), principalmente no cólon. A manifestação ocorre geralmente entre 4 e 14 anos de idade (MANGO; MEDEIROS; MALUF, 1994.)

A síndrome de Peutz-Jegher é uma doença rara e assim como os outros fatores genéticos hereditários, também é autossômica dominante. É caracterizada por pólipos principalmente intestinais, pigmentação escura geralmente ao redor dos lábios, mucosa oral, língua, nariz, às vezes também em volta dos olhos (HYER, 2001).

O HNPCC, também conhecido como Síndrome de Lynch, representa de 1 a 5% de todos os casos de câncer colorretal e é responsável por 20 a 30% dos casos de câncer de cólon hereditário (YU *et al.*, 2003). Este tipo de câncer apresenta um pequeno número de pólipos e penetrância de 80% a 90% (LYNCH, 1996). Mutações nos genes de reparo MSH2, MLH1, PMS1 e PMS2 podem resultar na produção de HNPCC (JORDE *et al.*, 2000). Esta síndrome é uma doença autossômica dominante, cinco vezes mais frequente que a PAF (LYNCH, 1966).

Enquanto que os tumores hereditários do intestino são causados principalmente por genes de predisposição ao câncer, com alta penetrância, os não hereditários, que compreendem cerca de 80% dos tumores, aparecem devido a uma interação de hábitos, metabolização de xenobióticos ambientais provenientes dos alimentos, fumo e poluentes; e outros, associados a fatores genéticos de suscetibilidade de baixa penetrância, sendo classificados como doença multifatorial com forte interação ambiental.

O processo de proliferação celular normal ocorre de forma controlada pela atuação de diversos genes de controle do ciclo celular, incluindo oncogenes e supressores de tumor. Dessa forma, a homeostase do tecido é mantida.

A célula tumoral desenvolve-se a partir do acúmulo de mutações somáticas em uma célula, ao longo do tempo. Essas mutações resultam em mudanças fenotípicas graduais que se iniciam a partir de células pré-neoplásicas, evoluindo para células neoplásicas. As etapas de desenvolvimento do câncer são: a iniciação, promoção e progressão (RUSSO, 2007; PITOT, 2007). Isto é válido tanto para tumores esporádicos como para as formas hereditárias, com a diferença de que nas formas hereditárias, o indivíduo já nasce com uma mutação de predisposição ao câncer, desta forma, a doença se manifesta mais precocemente, podendo ser multifocal.

A iniciação é uma fase irreversível e envolve a ação de agentes carcinogênicos químicos ou físicos que agem diretamente no DNA. A promoção corresponde à fase que ocorre o acúmulo de células pré-malignas anormais em divisão, devido a fatores epigenéticos. E a progressão é a fase na qual ocorre o crescimento do tumor e aquisição do potencial invasivo e metastático (ALMEIDA, 2005).

Várias mutações ocorrem nos genes relacionados ao controle da multiplicação celular durante o processo de carcinogênese. Os genes que sofrem mutações associados ao desenvolvimento do câncer são:

- Os oncogenes, que são genes responsáveis pela proliferação celular. Quando mutados, a célula é submetida a um crescimento celular desregulado, e à diferenciação. Os oncogenes são considerados dominantes, ou seja, uma única mutação é suficiente para desencadear o fenótipo (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2001). Os principais oncogenes envolvidos no CCR são os genes da família RAS composta de três genes: o K-RAS, o H-RAS e o N-RAS (BARBACID, 1987).

- Os genes supressores de tumores, que produzem proteínas que inibem a formação do tumor. A mutação nestes genes desencadeia a proliferação tumoral por falta de inibição da progressão do ciclo celular, estes são considerados "com efeito recessivo", ou seja, são necessárias duas alterações, nos dois alelos para perda total da função supressora (DE CASTRO COTTI, 2000). Os principais genes supressores de tumor relacionados ao câncer colorretal são o gene APC, DCC e o gene p53. (TAKAHASHI; WAKABAYASHI, 2004).

Outros genes podem estar relacionados ao processo de tumorigênese do carcinoma colorretal, como os genes de reparo do DNA, que quando alterados promovem uma instabilidade genômica que favorece a ocorrência de mutações.

Os genes *K-RAS* e *APC* estão envolvidos em processos iniciais, como na formação de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) e adenomas, e os genes *DCC* e o *TP53* estão envolvidos em etapas mais tardias na formação de adenocarcinomas (FEARON E VOLGESTEIN, 1990).

O gene *APC* é um supressor tumoral, regula a  $\beta$ -catenina intracelular, que é uma proteína relacionada à transcrição de DNA e processos de sinalização celular que afetam a apoptose e o crescimento das células. Mutações neste gene resultam na perda de sua função reguladora, com aumento de  $\beta$ -catenina, proliferação celular, além da transcrição de genes envolvidos no crescimento do epitélio do cólon. (KNUDSEN; BISGAARD; BÜLOW, 2003; MOISIO; JÄRVINEN; PELTOMÄKI, 2002; HERNEGGER; MOORE; GUILLEM, 2002). Mutações no gene *APC* foram encontradas em mais de 85% dos tumores de cólon (JORDE *et al.*, 2000).

*K-ras* é um oncogene que codifica uma molécula de sinalização intracelular. A via do gene *K-ras* produz a proteína K-ras, que está envolvida na regulação da expressão gênica e na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (VIGIL *et al.*, 2010). A proteína K-ras integra um grupo de proteínas juntamente com a H-Ras e a N-ras (BARBACID, 1987).

O *DCC* está localizado no braço longo do cromossomo 18 (MULERIS, 1984). Codifica uma proteína que está envolvida na comunicação intercelular (HEDRICK *et al.*, 1994). Em 70% dos casos de CCR possuem mutação onde está localizado o *DCC* e sua mutação está relacionada ao surgimento dos adenomas avançados (VOGELSTEIN *et al.*, 1988).

O gene *TP53* é ativado em resposta a sinais de danos celulares (JORDE *et al.*, 2000). É o gene mais associado com o câncer e sua mutação está relacionada a mais de 50 tipos diferentes de tumores. Além disso, suas mutações são identificadas em aproximadamente 70% dos tumores colorretais (LOSI *et al.*, 1996). Ele codifica uma proteína de 53kDa que é expressa quando o DNA celular sofre algum tipo de dano. Esta proteína impede que o ciclo celular ocorra até que o DNA seja reparado e se isto não acontecer, o gene induz a célula à apoptose (JORDE *et al.*, 2000).



Mutações no gene *TP53* estão associadas a tumores invasivos e avançados. Em adenomas, a frequência desta mutação é inferior a 6%, enquanto que em adenocarcinomas invasivos é de aproximadamente 75% (VOGELSTEIN *et al.*, 1988).

O CCR inicia-se a partir da progressão ordenada com alterações genéticas distintas e cumulativas. O pólipó adenomatoso progride devagar desde estágios iniciais benignos até o surgimento do câncer. A partir disto, Fearon e Vogelstein propuseram um modelo de carcinogênese, na qual as mutações nos genes supressores e oncogenes que levam ao desenvolvimento do CCR ocorrem em ordem específica (FEARON; VOGELSTEIN, 1990).

Na figura 1 encontra-se um esquema da progressão da carcinogênese do câncer de cólon, demonstrando diferentes etapas e mutações.

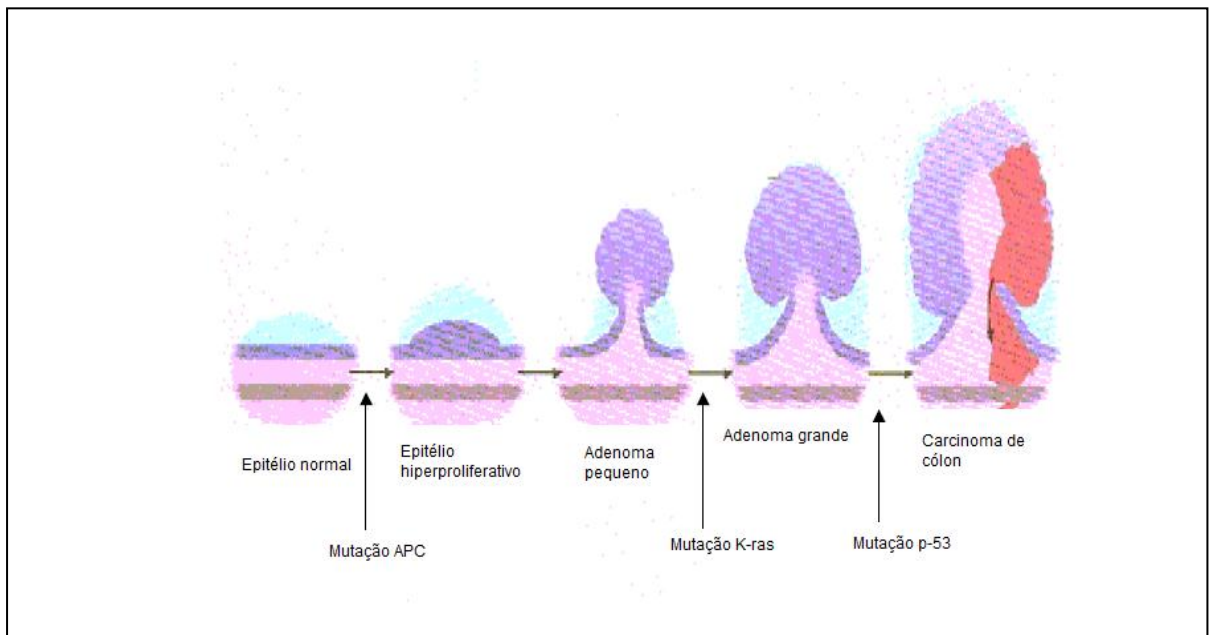


Figura 1: Progressão da carcinogênese do câncer de cólon.  
FONTE: HENRIQUES, 2003, apud WAITZBERG, 2009.

Do ponto de vista anatômico, a superfície do intestino grosso é revestida por criptas de Lieberkühn, células absortivas invaginadas (GARTNER, 2011). Essas células intestinais estão constantemente expostas aos íons ferro das carnes vermelhas, gorduras, álcool e microrganismos e doenças gastrointestinais, o que corrobora para inicialização do CCR (RIBEIRO *et al.*, 2007).

O processo de tumorigênese no intestino é iniciado por mutações genômicas que culminam no aparecimento de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) que são caracterizadas por alterações morfológicas nas criptas de Lieberkühn com aberturas

terminais alteradas, tamanho maior que as criptas adjacentes e espessamento epitelial com células proeminentes. Nem todos os FCA evoluem para uma displasia, entretanto possuem um comprovado potencial de malignização (CHENG; LAI, 2003).

Os FCA podem ser abaulados, côncavos ou planos e quando corados com azul de metileno ficam mais escuros que o tecido epitelial normal, permitindo assim o seu reconhecimento. Os FCA podem ser avaliados e caracterizados quanto a número, distribuição ao longo do colón e tamanho e seu aparecimento pode ser favorecido por diversos fatores como os genéticos, epigenéticos e os ambientais, dando como fator causal multifatorial (FENOGLIO-PREISER; NOFFSINGER, 1999).

O desenvolvimento do CCR envolve fatores genéticos e ambientais. Entre 50 e 80% dos casos de desenvolvimento de câncer colorretal estão envolvidos fatores ambientais e o principal fator é a dieta (ROYNETTE, 2004). Outros fatores aumentam o risco de desenvolvimento da doença como histórico familiar com CCR, idade acima de 50 anos, já ter desenvolvido outro tipo de câncer (ovário, útero ou mama), baixo consumo de cálcio e também obesidade e sedentarismo (INCA, 2015).

A incidência do CCR é diferente entre as regiões do mundo, o que indica uma forte influência de fatores locais. Observa-se essa diferença de forma semelhante no Brasil, onde as regiões Sul e Sudeste apresentam elevado número de ocorrência de CCR em relação às regiões Norte e Nordeste, possivelmente por causa de diferentes padrões de alimentação e desenvolvimento socioeconômico (FORTES, 2007). O padrão de incidência ou mortalidade por CCR tem sido buscado, por meio de estudos epidemiológicos (NEVES *et al.*, 2006).

Indivíduos oriundos de locais com baixa incidência de CCR (Ásia, África, Japão, China e América Latina) apresentam risco aumentado quando passam a viver em regiões onde a incidência desta enfermidade é significativa (Estados Unidos, Austrália e Europa) (SINGH e FRASER, 1998; LESER e SOARES, 2001; CHIU *et al.*, 2003). Além disso, aqueles que migram de países com uma alta incidência de CCR para países com baixa incidência, apresentam um risco reduzido de desenvolver essa enfermidade (GLINGHAMMAR *et al.*, 1997).

Wallace e Caslake (2001) relataram que 75% dos fatores de risco estão relacionados a fumo, obesidade, sedentarismo, envelhecimento e hábitos dietéticos. Destes, sem dúvida, o mais estudado é o hábito alimentar.

A alimentação e a nutrição têm muita importância na prevenção e também no aumento do risco de CCR (AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH FUND, 2007). O alto consumo de carnes vermelhas, gorduras, álcool e a obesidade estão associados a maior probabilidade de desenvolvimento de CCR (DRAY *et al.*, 2003).

Alguns mecanismos podem explicar os efeitos da dieta no CCR. Os alimentos consumidos podem influir na modificação da mucosa do órgão devido aos efeitos danosos dos ácidos biliares secundários, causar danos diretos ao DNA celular por produtos da peroxidação lipídica, mudar o metabolismo da flora bacteriana e diminuir a proteção devido à ingestão inadequada de antioxidantes (LESER e SOARES, 2001).

As carnes e peixes, de modo geral, são boas fontes de aminoácidos essenciais, ferro de alta biodisponibilidade, vitamina B12, B6 e selênio, e os peixes são também boas fontes de cálcio (BRASIL, 2005). O consumo de carne vermelha e os produtos derivados da carne, embutidos, hambúrgueres, salsichas aumentou consideravelmente, principalmente nas classes com maior renda, como nos Estados Unidos, norte da Europa, Oceania, partes da América do Sul e Ásia. Entre o ano de 1961 a 2002, o consumo de carne, principalmente de porco e aves, dobrou (AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH FUND, 2007).

A carne vermelha está associada ao CCR por vários motivos e um deles é método de preparação. O cozimento em altas temperaturas pode causar a formação de substâncias cancerígenas, principalmente hidrocarbonos aromáticos policíclicos (benzopireno) e aminas aromáticas heterocíclicas. Essas substâncias tóxicas são formadas durante a combustão de carbono e pirólise de proteína, que ocorre durante o assamento no carvão, frituras e defumação de carnes (SCOTT-STUMP & MAHAN, 2002). Quanto mais alta a temperatura durante o cozimento maior será a formação dessas substâncias (AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH FUND, 2007).

Além disso, em carnes processadas são utilizados nitrato e nitrito, que são utilizados no processo de cura para conferir cor e sabor aos produtos, além de funcionar como agente antimicrobiano e antioxidante (CASSENS, 1997). Estudos sugerem que a mucosa pode ser danificada por uma alimentação com alto consumo dessas substâncias, aumentando assim a vulnerabilidade a um carcinógeno (SCOTT-

STUMP e MAHAN, 2002). Recentemente a Organização Mundial de Saúde classificou os embutidos e carnes processadas como produtos carcinogênicos (IARC, 2015).

Outra hipótese que associa a carne vermelha ao CCR é pelo fato de serem ricas em ferro. Experimentos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o ferro possa desencadear efeitos mutagênicos, pois gera radicais livres que podem atingir o DNA e causar danos (AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH FUND, 2007).

As gorduras são fonte de energia e podem ser de origem animal e vegetal (BRASIL, 2005). Sua influência no CCR não é totalmente conhecida, mas pode variar de acordo com a origem e composição (GARAFOLO *et al*, 2004; SHILS *et al.*, 2002). As gorduras estão associadas ao CCR devido ao modo pelo qual os alimentos ricos em lipídios são preparados (altas temperaturas de preparo). Além disso, outro mecanismo pelo qual os lipídeos estão associados ao câncer pode ser mediado pelos sais biliares. As gorduras em excesso, quando estão no duodeno, estimulam maior secreção da bile. Os sais biliares possuem função detergente bem caracterizada, podendo gerar danos ao tecido, o que é associado ao aumento da proliferação celular (LESER; SOARES, 2001).

Por outro lado, verduras, frutas e fibras estão relacionadas à redução do risco de câncer colorretal. Segundo o Relatório Mundial da Saúde (2003), a baixa ingestão destes tipos de alimentos está entre os 10 principais fatores de risco que contribuem para a mortalidade no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2003).

As frutas e verduras são associadas à proteção contra o CCR devido aos efeitos de alguns compostos bioativos presentes nesses alimentos, como as vitaminas A, E, C, carotenoides, selênio, folato, tocoferóis, e compostos fenólicos, que constituem o principal antioxidante derivados da dieta (SINGH; FRASER, 1998; LESER; SOARES, 2001).

A importância do consumo de fibras para a prevenção do CCR foi sugerida, por Denis Burkitt, devido à alta quantidade de fibras que eram consumidas em alguns lugares da África e relacionados às baixas taxas de CCR (JACOBS *et al.*, 2006; MICHELS *et al.*, 2005). Uma alimentação pobre em fibras pode desencadear a constipação crônica e condições associadas, como diverticulite, considerados fatores risco para o CCR (LESER; SOARES, 2001).

Os antioxidantes estão associados à neutralização das espécies reativas de oxigênio. Podem ser úteis na redução dos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia por reduzir sua toxicidade (WEIJ; CLETON; OSANTO, 1997). Existem evidências que o uso de antioxidantes na intervenção terapêutica junto à quimioterapia auxilia na redução do tamanho do tumor e no aumento da longevidade dos pacientes (DRISKO; CHAPMAN; HUNTER, 2003).

As antocianinas, por exemplo, além do efeito antioxidante também ajuda na prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Do mesmo modo que estão associadas a efeitos anti-inflamatórios, anticarcinogênico, antidiabético e antimicrobiano (HE; GIUSTI, 2010; TSUDA, 2012).

Além dos fatores de risco ambientais, dos genes relacionados ao câncer, um dos fatores apontados como implicados nos processos de tumorigênese é a inflamação. A inflamação está diretamente relacionada à carcinogênese e a tumorigênese (MORRISON, 2012). Ela favorece o câncer de cólon por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), associadas à deficiência na produção de enzimas antioxidantes (SEIFRIED *et al.*, 2007; TUDEK; SPEINA, 2012; MORRISON, 2012).

## 1.2 Radicais Livres

Radical livre é toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados. Dessa forma, estas partículas possuem grande instabilidade elétrica e por isso, apresentam grande capacidade reativa, fazendo com que se ligue com qualquer composto que esteja próximo, a fim de captar um elétron para sua estabilização, independente de ser uma molécula, uma célula, ou tecido do organismo, culminando em reações em cadeia de lesão celular (HALLIWELL, 1987).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre por meio da ação de enzimas, durante o metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos como ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e cigarro (CERUTTI, 1991).

Em um sistema normal, existem mecanismos de controle dos radicais livres produzidos. Quando os sistemas biológicos apresentam dificuldade em neutralizar a produção excessiva de radicais livres, ocorre o estresse oxidativo. Este acúmulo de radicais livres pode ser mediador de importantes processos celulares causando danos em estruturas como proteínas, lipídios e DNA. Os radicais livres, quando em baixa quantidade, desempenham papéis fisiológicos importantes como atuar em mecanismos de defesa contra agentes infecciosos e modular vias de sinalização redox celulares (HALLIWELL, 2007). Contudo, o estresse oxidativo está relacionado ao envelhecimento e desenvolvimento de doenças como doenças neurodegenerativas, câncer, doenças cardiovasculares e *diabetes mellitus* (HALLIWELL 1987; CROSS *et al.* 1987; BAYNES 1991; COOKE *et al.*, 2003).

A produção das espécies reativas é controlada pelos sistemas de defesa antioxidante, cuja ação envolve mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (SIES 1993). As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). Os antioxidantes não enzimáticos incluem ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), tióis, bilirrubina, glutathione, carotenóides e flavonóides (MARITIM *et al.*, 2003).

Os antioxidantes naturais podem exercer seus efeitos de forma direta ou indireta (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2008).

Os antioxidantes diretos, atuam na neutralização de moléculas de ERO, como as vitaminas E e C. Já os antioxidantes indiretos ativam vias de sinalização envolvidas na resposta ao estresse, como as enzimas de detoxificação de fase 2. Plantas e vegetais ricos em compostos polifenólicos ativam este sistema antioxidante por meio das proteínas Nrf, podendo, desta forma, apresentar efeitos quimioterápicos benéficos para a saúde humana (SPORN; LIBY, 2005).

Os antioxidantes provenientes de alimentos têm sido estudados, dentre eles as antocianinas, presentes no açaí Juçara, com o objetivo de melhorar as defesas antioxidantes do organismo e juntamente com as enzimas endógenas reduzir os níveis de estresse oxidativo e o processo de envelhecimento.

### 1.3 Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) foi descoberta em 1968, como uma enzima específica para a remoção catalítica de um radical de oxigênio (MC CORD & FRIDOVICH, 1969). Antes de ser descoberta, a SOD já havia sido descrita por alguns autores como uma proteína que contém cobre, mas não havia sido relacionada a nenhuma atividade catalítica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

Correspondendo a 1% do total de proteína celular a SOD1 é bastante abundante e está presente em todas as células eucarióticas (OKADO-MATSUMOTO & FRIDOVICH, 2001).

A função da SOD é catalisar a conversão do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esta enzima pertence a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD: A SOD-manganês que está localizada primariamente na mitocôndria e a SOD cobre-zinco (SOD1) que atua no citosol (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O íon cobre se liga no sítio catalítico por interações com os nitrogênios do grupo imidazol de quatro histidinas (46, 48, 120 e 63) e o íon zinco liga-se com o imidazol das histidinas 63, 71, 80 e com o grupo carboxila do aspartato (Figura 2).

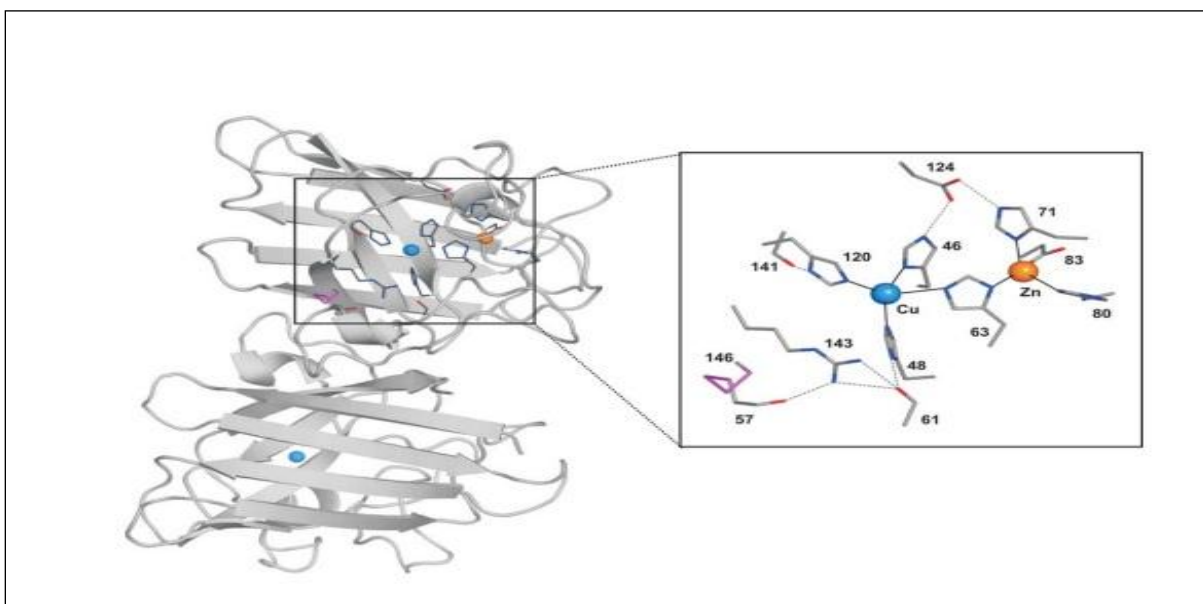
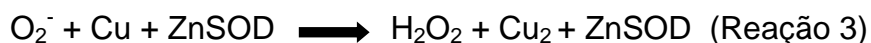
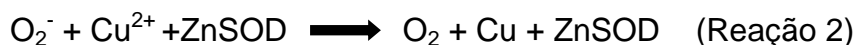
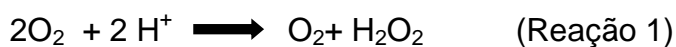


Figura 2: Estrutura da SOD1, com destaque para o sítio ativo. Os íons de cobre e zinco são respectivamente, as esferas azul e laranja.

FONTE: Valentine *et al.*, 2005.

A SOD1 é muito estável, apresenta-se mais resistente as variações de temperatura e à desnaturação por substâncias como cloreto de guanidina, duodecil sulfato de sódio, ou uréia e é constituída de duas subunidades proteicas idênticas, com um átomo de cobre e um de zinco em cada uma delas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

A superfície da SOD1 possui muitos resíduos de aminoácidos com carga negativa. Isto favorece o direcionamento do ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ), que é repelido por esta superfície, até o sítio catalítico através de um canal formado por resíduos carregados positivamente. No sítio ativo ocorre a dismutação do  $O_2^-$  a oxigênio ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (reação 1). A catálise ocorre em dois passos: Uma molécula de  $O_2$  reduz o íon cúprico ( $Cu^{2+}$ ) liberando  $O_2$  (reação 2). Uma outra molécula de  $O_2$  reoxida o íon cuproso ( $Cu^+$ ), formando  $H_2O_2$  (reação 3) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; AUGUSTO, 2002).





A  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser convertida em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  pela GPx ou pela catalase ou pode ser convertida no radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ) por meio da reação com alguns metais de transição na chamada reação de Fenton (VALKO *et al.*, 2007).

#### 1.4 Açaí Juçara

O açaí é fruto da palmeira *Euterpe oleracea* Martius, nativa da região Amazônica. Possui grande importância econômica, sendo um dos principais produtos de exportação da região amazônica na forma de polpa congelada, suco ou vinho (RIBEIRO *et al.*, 2010).

A espécie *Euterpe edulis* Martius, é típica da Floresta Atlântica e é encontrada desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul e popularmente conhecido como palmito doce, palmito branco, palmito verde e juçara. Os frutos possuem propriedades organolépticas e nutritivas similares às do açaí. Esta espécie está com a população reduzida nas reservas naturais devido à exploração extrativista. (SILVA; BARRETO; SERÔDIO, 2004; LIMA *et al.*, 2008).

A utilização dos frutos da palmeira Juçara é fonte de renda para as comunidades na Mata Atlântica e também é uma alternativa para a manutenção da espécie, visto que não é necessário o corte da árvore para retirada dos mesmos como é feito para a obtenção do palmito (COSTA *et al.*, 2006). Além disso, a palmeira Juçara possui considerável importância ecológica, ao desempenhar um papel fundamental na nutrição da fauna da Mata Atlântica por meio de seus frutos (REIS e KAGEYAMA, 2000).

O fruto possui alto valor energético devido a elevado teor de lipídeos, além de possuir consideráveis níveis de carboidratos, proteínas e minerais, especialmente potássio, ferro e zinco (SILVA; BARRETO; SERÔDIO, 2004).

Além disso, o açaí Juçara possui propriedades antioxidantes e características nutricionais e sensoriais semelhantes ao açaí (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; SCHAUSS *et al.*, 2006a).

Silva, Barretto e Serôdio (2004) compararam a polpa de açaí com a polpa dos frutos da palmeira Juçara produzida no sul da Bahia e encontraram diferenças significativas entre a composição dos frutos destas duas espécies. Os resultados evidenciaram que os frutos da palmeira Juçara possuem minerais como potássio, ferro e zinco, em quantidades próximas ou superiores às dos frutos do açaizeiro. Os teores de potássio, ferro e zinco encontrados na palmeira Juçara foram de 65,7%, 70,3% e 20,8% superiores, respectivamente, aos encontrados no açaí. Os conteúdos de fósforo e cobre foram significativamente maiores no açaí, e o cálcio, magnésio e manganês não apresentaram diferenças significativas.

Em um estudo realizado por Schirmann (2009), o teor médio de ácidos graxos insaturados encontrados para as duas espécies foi semelhante. Dentre os ácidos graxos insaturados com maior concentração destacam-se o ácido graxo oleico e o linoleico. O açaí Juçara pode ser considerado uma excelente fonte de ácidos graxos insaturados essenciais na dieta humana, entretanto, o alto teor dessa fração lipídica favorece a rápida oxidação e rancificação da polpa de açaí Juçara (ROGEZ, 2000).

O conteúdo de antocianinas encontrado por Laderoza *et al.* (1992), no açaí foi de 336 mg/100 g e dos frutos da palmeira Juçara foi de 1.347 mg/100 g. Em análise realizada por Inácio *et al.* (2013) foi encontrado cerca de 10 vezes mais antocianinas no açaí Juçara (36,9 g/kg) que no fruto do açaí (3,3 g/kg).

Em outro estudo, o teor de antocianinas totais encontrado no açaí Juçara (2956 mg/100 g de massa seca) foi muito superior ao de outras frutas tropicais, tais como a acerola roxinha, o guajiru e o jambolão (respectivamente, 261, 958 e 771 mg/100 g de massa seca) (DE BRITO *et al.*, 2007).

O açaí Juçara vem se destacando no cenário nacional por sua composição química, fitoquímica e possíveis efeitos benéficos à saúde, com a caracterização e quantificação de seus compostos fenólicos, principalmente os flavonoides e mais especificamente as antocianinas, que pertencem à classe dos antioxidantes, muito importantes na neutralização das espécies reativas.

### 1.4.1 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturais solúveis em água que colorem, em azul, vermelho ou violeta diversos frutos e flores (GLOVER; MARTIN, 2012). São instáveis em pH alcalino, sensíveis a luz e são degradadas em temperatura acima de 25°C e presença oxigênio (LOPES *et al.*, 2007). A capacidade antioxidante das antocianinas é atribuída a sua estrutura fenólica, que permite se ligar aos elétrons desemparelhados das moléculas das espécies reativas de oxigênio (ERO) como o superóxido ( $O_2^-$ ), oxigênio singlet ( $O_2$ ), peróxido ( $ROO^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila (OH) (VOLP *et al.*, 2008, WANG; JIAO, 2000). Wang e Stoner (2008) afirmam que a atividade anticarcinogênica das antocianinas está relacionada à sua capacidade de sequestrar ERO.

As antocianinas estão no grupo de polifenóis mais abundantes em alimentos e, além de sua capacidade antioxidante, também possui vários efeitos benéficos à saúde que estão relacionados ao seu consumo, como efeitos anti-inflamatório, anticarcinogênico, antidiabético e antimicrobiano e a prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. (HE; GIUSTI, 2010; TSUDA, 2012).

Kang *et al.* (2003) encontraram redução de adenomas intestinais em ratos que consumiram extrato de antocianinas em sua dieta. Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Cooke *et al.* (2006).

As antocianinas encontradas em maior quantidade na polpa de açaí são a cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutenosídeo (SCHAUSS *et al.*, 2006b; PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2010). A cianidina-3-sambiosídeo, peonidina-3-glicosídeo e peonidina-3-rutenosídeo estão presentes em menores quantidades. (SCHAUSS *et al.*, 2006b).

Alguns autores desconsideram a ação antioxidante direta dos compostos dietéticos por causa da baixa biodisponibilidade. Entretanto, evidências epidemiológicas demonstram que antioxidantes presentes em frutas e vegetais podem contribuir para a prevenção ou afetar o desenvolvimento de algumas doenças (WOOTTON-BEARD; RYA, 2011). A biodisponibilidade dos compostos fenólicos pode ser subestimada devido a uma falha ou incapacidade de medir os metabólitos secundários durante o processo de digestão (MANACH *et al.*, 2004).

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da suplementação com açaí Juçara na contagem de focos de criptas aberrantes e na expressão de Superóxido dismutase 1 em intestino grosso de ratos submetidos e não submetidos à carcinogênese com a substância 1,2-dimetilhidrazina (DMH).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Relacionar a ingestão de açaí Juçara com o número de focos de criptas aberrantes no intestino grosso de ratos submetidos e não submetidos à carcinogênese.
- Avaliar a expressão de superóxido dismutase 1 em intestino grosso de ratos submetidos e não submetidos à carcinogênese, por meio das análises semi-quantitativa e quantitativa, e correlacionar com a suplementação alimentar de açaí Juçara.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos éticos**

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o número 043/2013 (ANEXO).

#### **3.2. Animais e Indução neoplásica**

Foram utilizadas 21 fêmeas de ratos da linhagem Fisher (*Rattus norvegicus* variedade *albinus*), com cerca de 45 dias de idade, procedentes do Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Ouro Preto.

Os animais permaneceram por quatro meses no Biotério do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET/CCA/UFES), mantidos em gaiolas coletivas de polietileno, cobertas com grade de metal, contendo de três a quatro animais por gaiola. Durante esse período, receberam dieta padrão e água a vontade e foram mantidos à temperatura entre 21° e 24°C, em fotoperíodo de 12 horas. Nesse período, 16 animais foram submetidos ao protocolo de indução do câncer colorretal e divididos em dois grupos experimentais. Cinco animais foram mantidos como controle sem indução neoplásica.

O protocolo de indução neoplásica foi aplicado em todos os animais dos dois grupos experimentais. Para indução do câncer colorretal, utilizou-se o agente químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH), conforme metodologia descrita por Barros (2006).

A preparação do agente indutor neoplásico ocorreu imediatamente antes do uso, sendo dissolvido na concentração de 800 mg/100 mL de água destilada, acrescida de 37mg/100 mL de agente estabilizador EDTA. A solução foi mantida em pH 6,5, pela adição de 15 a 20 gotas de hidróxido sódio 0,1N.

Após preparação, foram realizadas duas aplicações intraperitoneais da solução indutora, com intervalo de 15 dias entre dose, na concentração de 25 mg/kg do animal.

### **3.3. Polpa de açaí Juçara**

Foram utilizados dois lotes de polpa de açaí Juçara, isenta de corantes e conservantes, adquiridos de um produtor da região Sul do Estado do Espírito Santo. As polpas foram armazenadas ao abrigo da luz e oxigênio, em temperatura abaixo de 25°C. Foi realizada a quantificação de antocianinas no Laboratório de Análises Bromatológicas do Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Espírito Santo, pela metodologia de pH único.

Na análise da quantidade de antocianinas, realizou-se uma extração prévia de 12 horas sob refrigeração em etanol acidificado e filtração em funil de buchner para obtenção de um extrato isento de sólidos em suspensão. A absorvância do extrato obtido foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de máxima absorvância ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) em pH único, sendo utilizado o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) da antocianina majoritária para o cálculo das antocianinas totais.

### **3.4. Procedimento experimental**

Sessenta dias após o procedimento de indução neoplásica, todos os animais (grupos experimentais e grupo controle) foram transferidos para o Laboratório de Nutrição Experimental do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo e alocados em gaiolas individuais com água a vontade e dieta padrão para a espécie, sendo os animais identificados conforme grupo experimental, a saber: grupo induzido à carcinogênese e suplementado com açaí Juçara (RCA) - (8

animais), grupo induzido à carcinogênese e não suplementado com açaí Juçara (RSA) - (8 animais), grupo controle ausente de indução à carcinogênese e não suplementado com açaí Juçara – (5 animais).

Os animais do grupo induzido não suplementado com açaí Juçara continuaram com a dieta padrão. Os animais do grupo induzido suplementado com açaí Juçara (RCA) receberam açaí três vezes por semana durante um mês, simulando o consumo de um indivíduo humano normal.

A suplementação com o açaí Juçara ocorreu na forma de suco que foi preparado na proporção de uma parte de polpa para duas de água, conforme indicação do fabricante da polpa. Foram preparados 100 mL de suco para cada animal, na concentração de 30%. As preparações foram colocadas em garrafas e disponibilizadas aos animais por 12 horas, três dias por semana, por um mês, totalizando 14 dias de suplementação, durante fotoperíodo de escuridão. Água e alimentação foram mantidas normalmente até o fim do experimento.

Ao final das 12 horas, o volume do suco foi quantificado para aferição do consumo por cada animal.

### **3.5. Contagem dos focos de criptas aberrantes e cortes histológicos**

Os animais utilizados neste experimento foram sacrificados 30 dias após o início da suplementação pelo açaí Juçara. O procedimento de sacrifício obedeceu a normas de experimentação animal. Para tanto, utilizou-se o anestésico injetável Cetamina em associação à Xilazina na dose de 60 a 80mg de cetamina + 8 a 15 mg de xilazina, ambas/ kg de peso vivo. Procedeu-se à abertura da cavidade abdominal, retirada do monobloco e separação do intestino grosso. Os intestinos foram seccionados a partir da inserção do mesentério em toda sua extensão para a contagem dos Focos de Criptas Aberrantes (FCA).

Após abertura, os intestinos foram lavados em solução PBS para a retirada do conteúdo fecal e colocados em formalina tamponada 10% para fixação. Após a

fixação foram corados em solução de azul de metileno a 1%, por 2 minutos, seguido por lavagem tampão fosfato (PBS) e então realizada a contagem dos FCA's. A mucosa intestinal foi analisada com o auxílio de microscópio Nikon® com lente binocular, objetiva de 5x, para a identificação dos FCA, de acordo com Bird (1987).

Posteriormente, foram incluídos em parafina; seguindo rotina de preparo padronizado dos procedimentos histológicos. Os blocos foram seccionados em cortes de três micrômetros de espessura e as lâminas preparadas para avaliação imuno-histoquímica. Todas estas etapas foram realizadas no Laboratório de Patologia do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

### **3.6. Imuno-histoquímica**

A sequência da coloração imuno-histoquímica utilizada foi:

a) Preparação dos cortes histológicos (desparafinização e hidratação):

Xilol I – 10 minutos

Xilol II - 5 minutos

Álcool I – 5 minutos

Álcool II – 5 minutos

Álcool III – 5 minutos

- 3 banhos de 3 minutos em Água Destilada.

b) Recuperação antigênica:

- As lâminas foram mergulhadas em solução de citrato de sódio pH 6,0 e levadas ao microondas por 15 minutos, sendo o volume de citrato de sódio repostado a cada 3 minutos.

c) Bloqueio da peroxidase endógena

- Com solução de metanol e peróxido de hidrogênio (9:1), por 20 minutos.

d) Bloqueio de proteína inespecífica

- As lâminas foram mantidas em solução de leite em pó Mollico® diluído em solução de Tris por 1 hora.

e) Diluição de anticorpo primário anti-SOD1 a 1:150



- f) Aplicação do anticorpo primário anti-SOD1, e incubação em geladeira overnight.
- g) No dia seguinte, 3 lavagens com tampão TRIS.
- h) Aplicação do polímero conjugado à peroxidase, por 30 minutos.
- h) Lavagem com tampão TRIS.
- i) Aplicação da solução de substrato-cromógeno DAB, diluição de 1:50 por 5 minutos.
- j) Lavagem em água destilada.
- k) Contra coloração das lâminas com hematoxilina, por 5 minutos.
- l) Lavagem das lâminas em água corrente por 1 minuto.
- m) Lavagem das lâminas em água destilada por 1 minuto
- n) Hidratação das lâminas em passagem de 1 minuto cada, em etanol I, etanol II , etanol III, xilol I e xilol II.
- o) Montagem com lamínula usando o meio de montagem Tissue Tek.

O processamento imuno-histoquímico foi realizado com a utilização de anticorpo primário Anti-Superoxide Dismutase 1 antibody, AB13498, Abcam, Cambridge MA na diluição 1:150, padronizado em tecido de intestino de rato. As lâminas foram incubadas com o sistema de detecção para tecido de rato (N-Histofine – Simple Stain Max PO Rat, 414191F, NICHIREI®) a 25°C por 30 min. Para a revelação foi utilizada a 3'3-diamino benzidina (DAB, Sigma®) e a obtenção de expressão de SOD1 na coloração marrom.

Foram realizados controles positivo e negativo utilizando amostras com a expressão da SOD1 previamente conhecida em tumor colorretal conforme convencionado: um controle positivo, e três negativos, sendo o primeiro sem anticorpo primário, o segundo sem anticorpo secundário e o terceiro sem a reação de revelação. Para a revelação foi utilizada o DAB, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e montadas com lamínula e fixada com resina.

### 3.7. Análise semi-quantitativa da expressão de SOD1 e obtenção do escore de expressão

Para cada animal foram obtidas 10 imagens do intestino grosso com o auxílio de Microscópio de luz Nikon® com lente binocular, objetiva de 40X, acoplado à câmera de vídeo Samsung® conectada ao computador. A captura das imagens ocorreu em computador com a utilização do Software DinoCapture®. Cada imagem foi codificada e arquivada (para documentação).

As imagens foram capturadas aleatoriamente a partir do centro da imagem do intestino em rocambole, em direção as extremidades, em quatro linhas imaginárias, duas no sentido vertical (para cima e para baixo) e duas no sentido horizontal (esquerda e direita).

A expressão da SOD1 foi avaliada de forma semi-quantitativa utilizando dois padrões de análise, a intensidade de coloração e o percentual de células marcadas.

Para a análise de intensidade de coloração foram atribuídos os seguintes valores, 0 (marcação nula), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada) e 3 (marcação forte). Para percentual de células marcadas, a pontuação 0 foi atribuída quando todas as células eram negativas; 1 quando 1-25% das células eram positivas, 2 quando 25-50% das células eram positivas e 3 quando >50% das células eram positivas. Finalizou-se com a multiplicação dos scores para cada campo, seguindo a metodologia de análise de Soini *et al.* (2000), modificada por Campos *et al.* (2009). O resultado da multiplicação foi utilizado para categorizar as expressões citoplasmáticas da proteína estudada em:

- ❖ Marcação negativa = 0;
- ❖ Marcação positiva fraca = 1-3;
- ❖ Marcação positiva forte = >3.

Desta forma, foi considerada marcação fraca, quando as multiplicações entre o número de células marcadas vezes a intensidade da marcação foi menor ou igual a 3. Foi considerada marcação forte, quando a multiplicação resultou em número maior que 3 (Figura 3). Assim, escores foram atribuídos a cada imagem obtida e o escore médio de cada animal recuperado pela média aritmética.

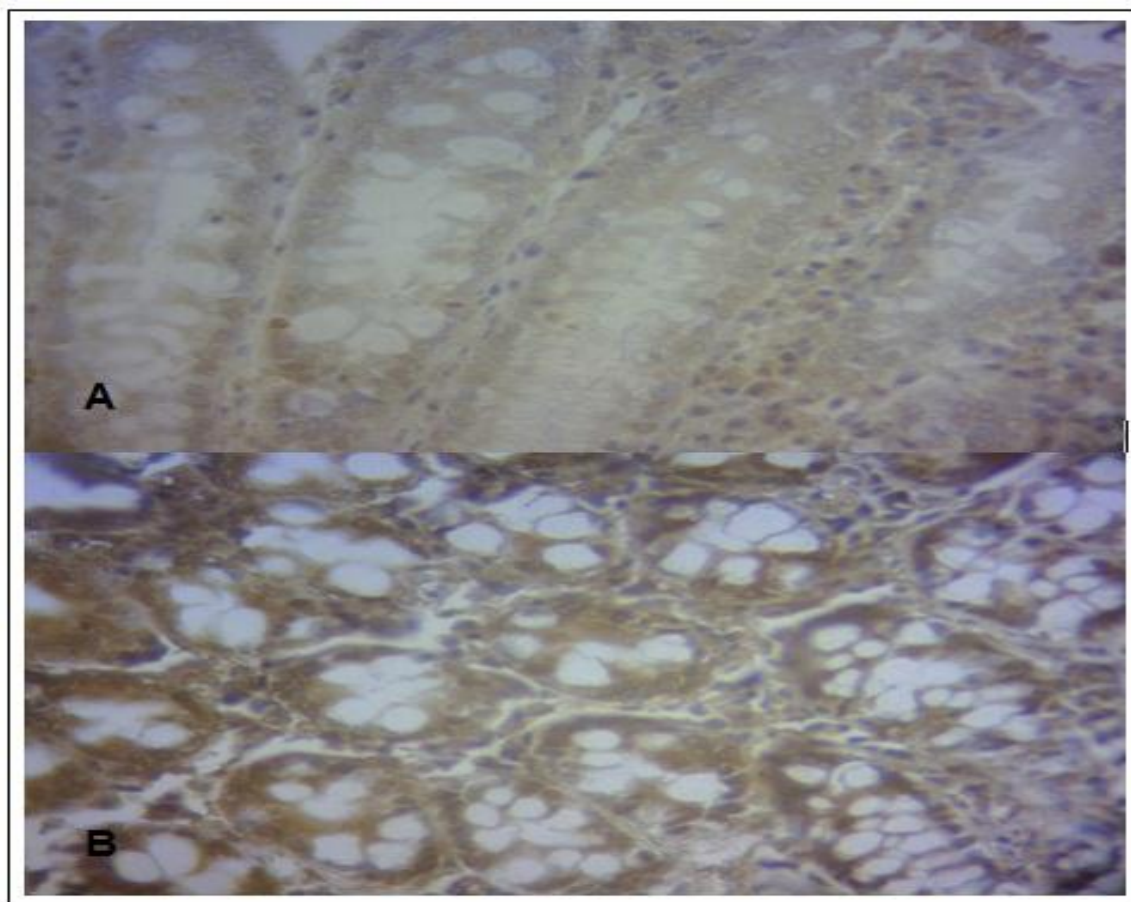


Figura 3: Fotomicrografia de mucosa intestinal de ratos submetidos à carcinogênese colorretal com 1,2-dimetilhidrazina imunopositiva para SOD1. (A): exemplo de escore 1-3 de expressão, (B): exemplo de escore >3 de expressão. IHQ, DAB (40X).

### 3.8. Análise quantitativa da expressão de SOD1

As imagens obtidas para a análise semi-quantitativa foram utilizadas para a análise quantitativa que consistiu no cálculo do percentual de ocupação da superóxido dismutase 1 por imagem obtida, seguida do percentual médio calculado pela soma dos percentuais obtidos dividido pela quantidade de imagens (10 imagens).

Selecionou-se, de cada imagem, a área correspondente à coloração marrom (imunopositivas para SOD1) que foi confrontada com a área total da imagem e multiplicada por 100. Essa análise foi realizada usando o software Adobe Photoshop CC 2015<sup>®</sup>, sem filtros nas imagens, com tolerância 10 e amostra de ponto.

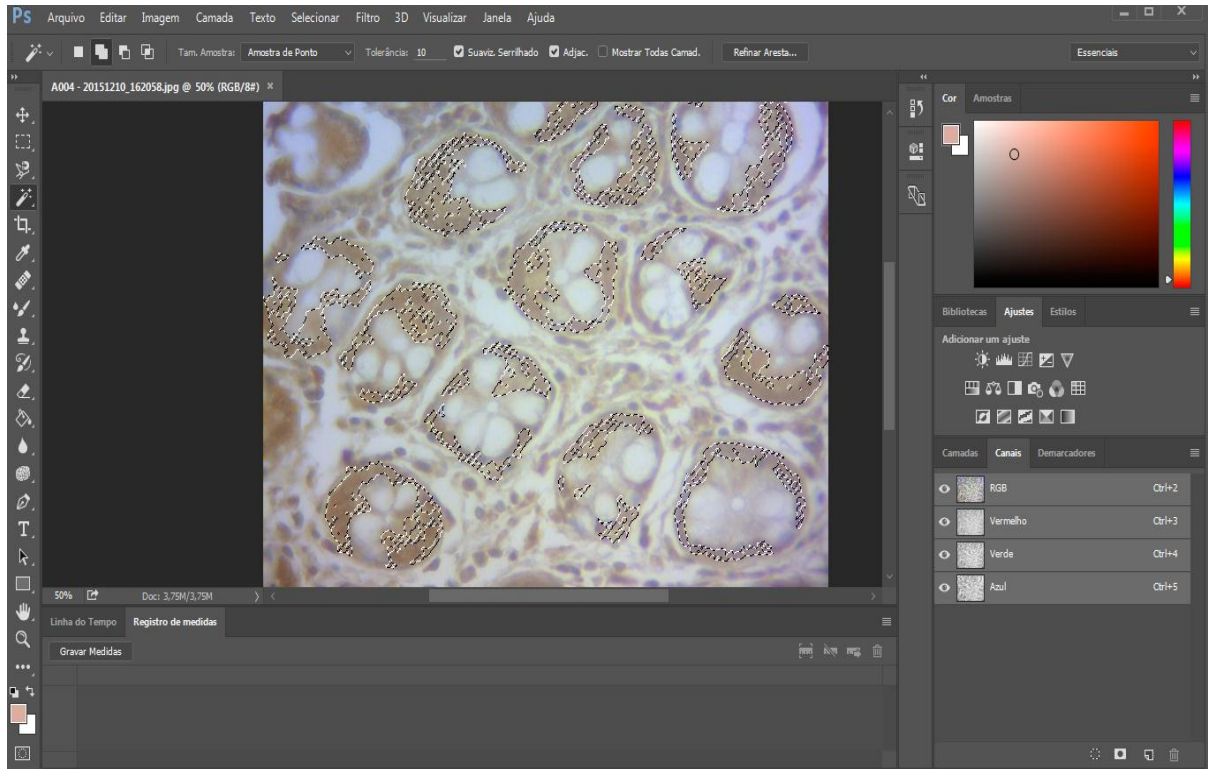


Figura 4: Captura de tela do programa Photoshop CC 2015<sup>®</sup> para exemplificar a metodologia utilizada na quantificação do percentual de ocupação da SOD1 (área pontilhada) em mucosa colorretal de ratos.

### 3.9. Análise estatística

A análise de associação dos dados obtidos foi realizada utilizando-se os testes paramétricos do Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA e teste t de Student. Para todos os testes o nível de significância foi de 5% e os cálculos obtidos no programa Biostat 5.0<sup>®</sup>.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Consumo do suco de açaí Juçara

O valor médio de antocianina encontrado foi de 73,4 mg/100g.

O consumo médio de suco da polpa de açaí Juçara foi de 35 mL/ 12 horas, variando entre 25 mL e 45 mL/ 12 horas, garantindo a ingestão de quantidade satisfatória de açaí Juçara (Figura 5).

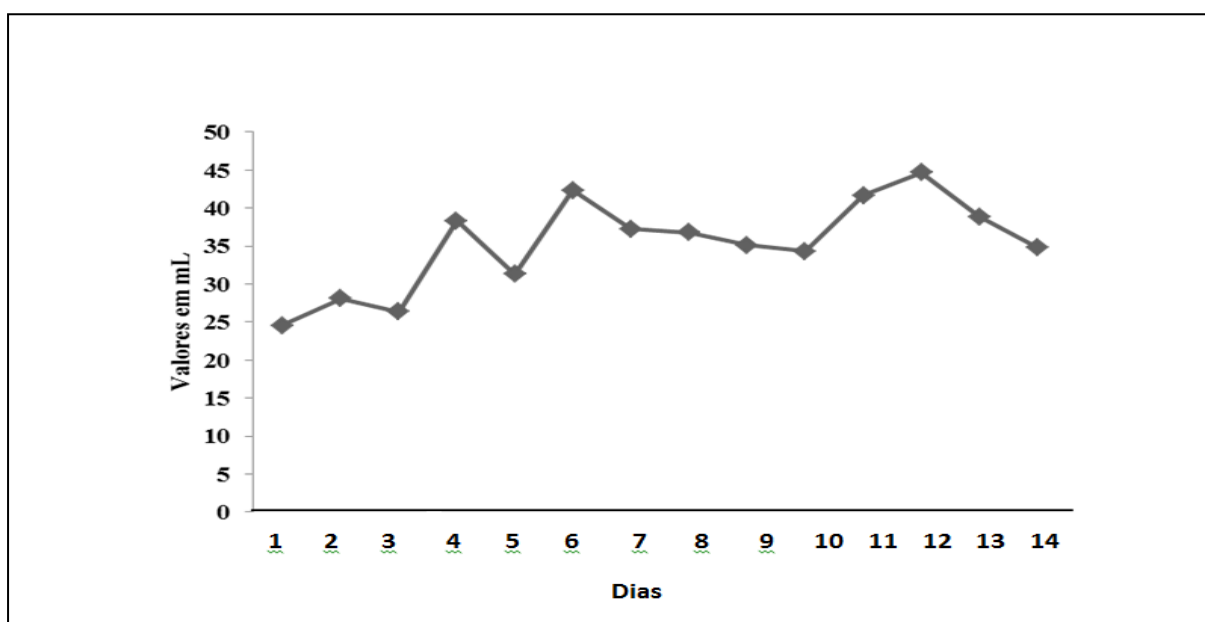


Figura 5: Média do consumo de açaí Juçara pelos animais do grupo experimental RCA, após 14 dias de suplementação.

Fonte: LUZ, 2014.

### 4.2. Análise do número de focos de criptas aberrantes - FCA

A análise do número focos de criptas aberrantes foi realizada nos grupos de ratos induzidos ao câncer e suplementado com açaí Juçara (RCA) e no grupo induzido e não suplementado (RSA). Na Figura 6, observa-se imagem de FCA encontrados no intestino grosso dos ratos, submetidos ao protocolo de indução de câncer com DMH.

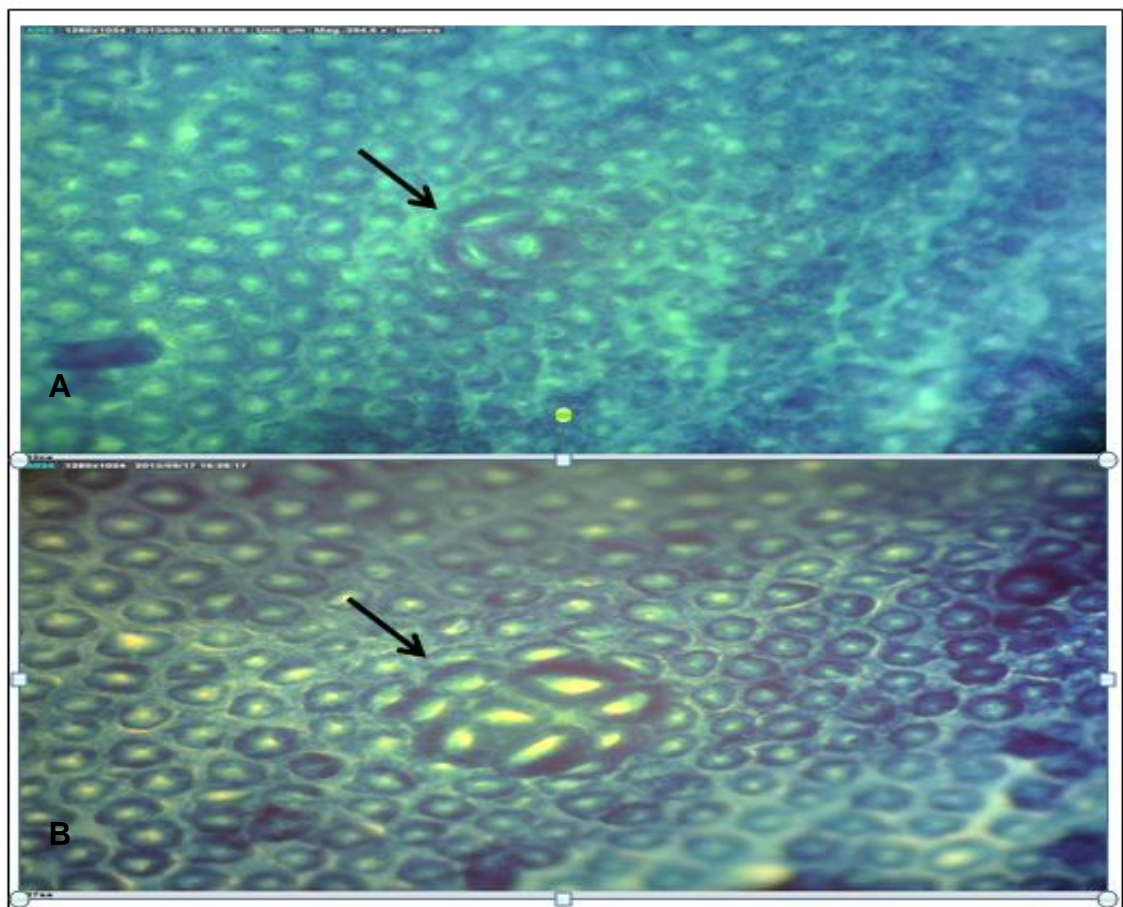


Figura 6: Fotomicrografia de mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina corada com azul de metileno e evidênciação de focos de criptas aberrantes - FCA (seta). A) Grupo experimental suplementado com açai Juçara e evidênciação de FCA com quatro criptas (50X) B) Grupo experimental não suplementado destacando FCA com nove criptas (50X).  
Fonte: LUZ, 2014.

Os resultados mostraram haver redução significativa no número de focos de criptas aberrantes no grupo RCA ( $p=0,0226$ ). Na Figura 7 pode ser observada a comparação entre os valores totais (Figura 7A) e as médias de FCA (Figura 7B) dos grupos de estudo.



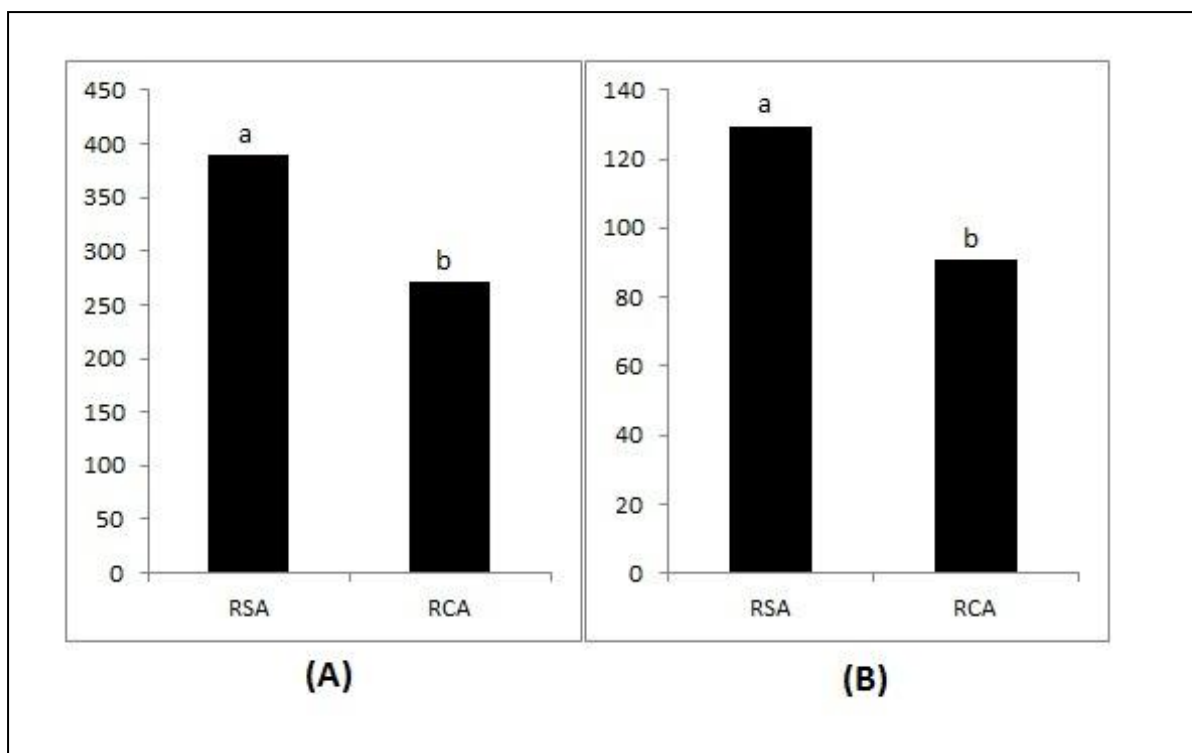


Figura 7: (A): Valor total de focos de criptas aberrantes encontrados no intestino grosso dos grupos não suplementados (RSA) e suplementados (RCA). (B): Média de focos de criptas aberrantes encontrados no intestino grosso dos grupos não suplementados (RSA) e suplementados (RCA). As médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3. Expressão de SOD1 por análise semi-quantitativa

A análise do escore de expressão da SOD1 foi realizada nos intestinos dos ratos: controle, grupo induzido à carcinogênese e não suplementado (RSA) e induzido à carcinogênese e suplementado com açaí Juçara (RCA).

Os resultados mostraram que houve diferença nos escores de expressão da SOD1 entre os grupos estudados ( $p = 0,0006$ ). No entanto, o escore de expressão de SOD1 nos animais do grupo controle quando comparados aos animais do grupo RSA não diferiram significativamente, ao passo que, a suplementação aumentou de maneira significativa o escore de expressão da SOD1 na mucosa colorretal dos animais do grupo RCA em relação aos animais do grupo controle (Figura 8).

A comparação entre os grupos induzidos a carcinogênese colorretal mostrou que o escore de expressão da SOD1 no intestino de ratos do grupo RCA foi maior que o

escore encontrado nos animais pertencentes ao grupo RSA ( $p < 0.0001$ ), conforme observado na Figura 8.

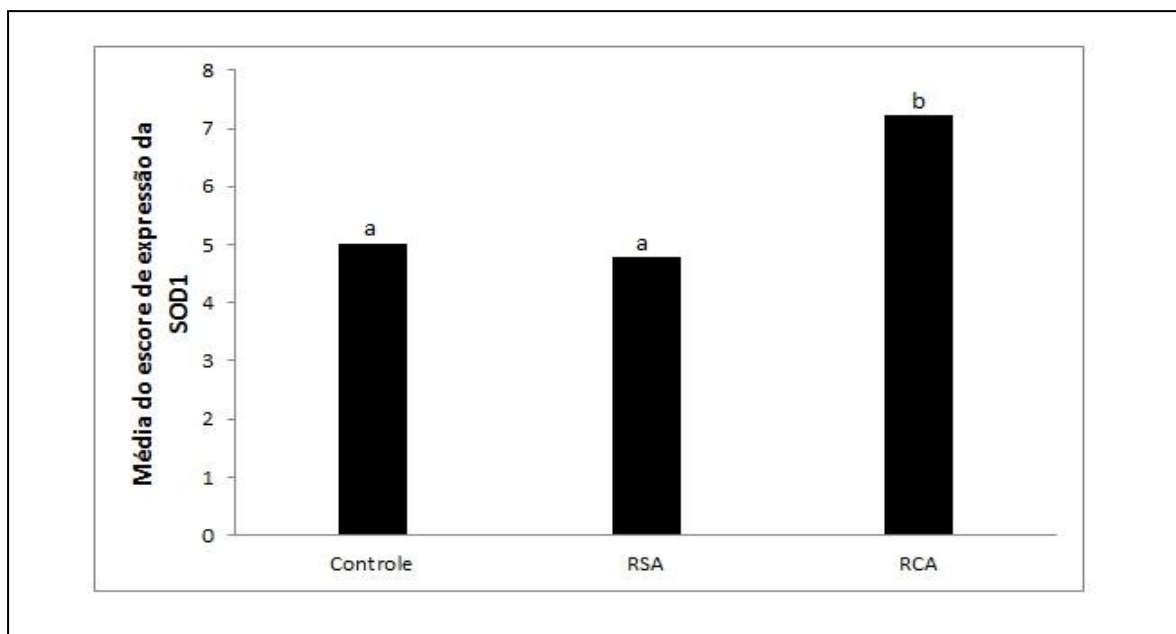


Figura 8: Comparação das médias dos escores de expressão da SOD1 na mucosa colorretal de ratos entre o grupo Controle e os grupos induzidos com (RCA) e sem suplementação (RSA). As médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de ANOVA, post hoc Dunnet ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Expressão de SOD1 por análise quantitativa

Foi realizada a análise quantitativa de expressão da SOD1, com avaliação da porcentagem da área de marcação positiva da SOD1. Os valores das médias e desvio padrão encontram-se na Tabela 1.

A análise comparativa da área percentual demonstrou haver diferença significativa entre os grupos estudados, no entanto, a comparação entre o grupo controle e grupo induzido e não suplementado (RSA) revelou igualdade no percentual de ocupação da SOD1 na mucosa colorretal, ao passo que o grupo induzido e suplementado (RCA) apresentou percentual de área de marcação da SOD1 maior que o grupo controle. (Figura 9).

Além da comparação entre ratos induzidos suplementados e não suplementados com o controle, foi realizada também a análise da expressão da SOD1 em ratos induzidos suplementados (RCA) e induzidos não suplementados com açaí Juçara



(RSA). Os resultados mostraram haver diferença na porcentagem de área de marcação positiva da SOD1 na mucosa colorretal de ratos com lesão pré-neoplásica, com aumento significativo da marcação nos ratos suplementados com açai Juçara ( $p=0,0382$ ) (Figura 9).

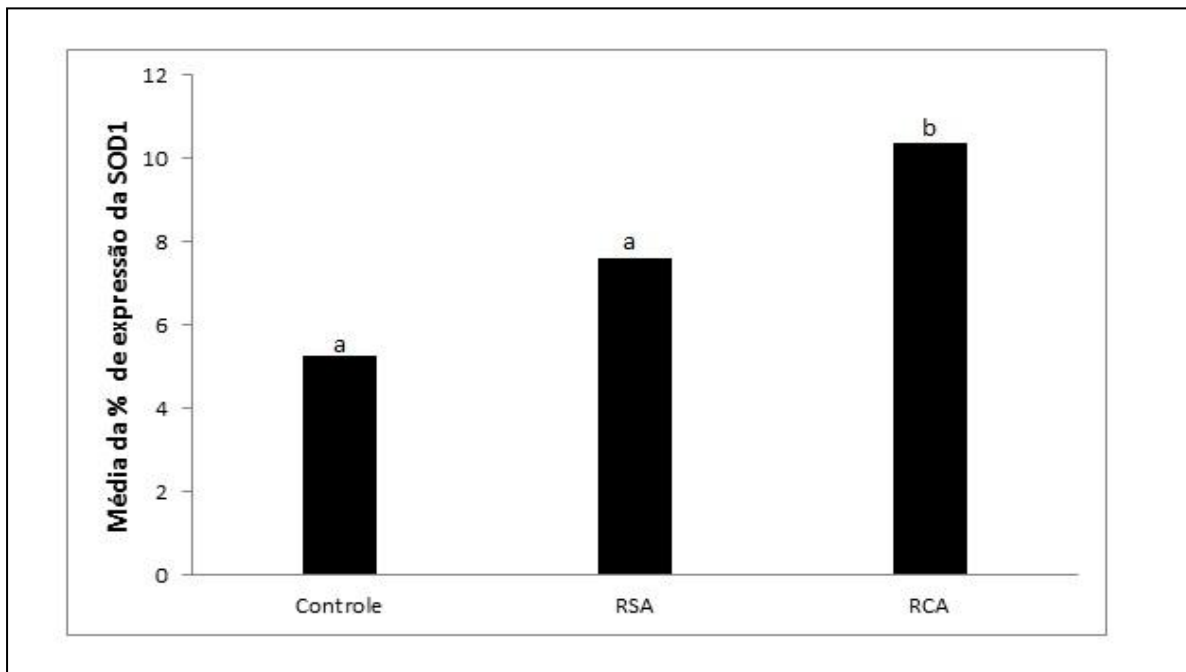


Figura 9: Comparação das médias da % de expressão da SOD1 na mucosa colorretal dos ratos do grupo Controle e grupos induzidos com (RCA) e sem suplementação (RSA). As médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de ANOVA, post hoc Dunnet ( $p<0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A alimentação é um dos maiores e mais estudados fatores de risco para CCR, contribuindo de forma determinante, tanto de modo preventivo como desencadeador.

Estudos epidemiológicos demonstraram a relação entre obesidade, consumo exagerado de carnes vermelhas, gorduras e álcool com o aumento do risco de câncer colorretal (LESER; SOARES, 2001; HARSSHMAN; ALDOORI, 2007).

De forma inversa, também é de conhecimento que o consumo regular de frutas e vegetais aumenta a proteção do organismo em relação ao desenvolvimento de

doenças crônicas não transmissíveis como o câncer colorretal (RIBOLI; NORAT, 2003). Esta ação protetora tem sido atribuída principalmente às ações antioxidantes de alguns nutrientes, como a vitamina C, carotenoides e os compostos fenólicos (POLI *et al.*, 2008; SZMITKO; VERMA, 2005).

Nesse sentido a utilização do açaí tem aumentado pela sua composição rica em compostos fenólicos, principalmente ao teor de antocianinas (MENEZES *et al.*, 2008). Quando comparada a outros alimentos, a polpa do açaí possui grande capacidade antioxidante baseado em análises, principalmente contra o superóxido e radicais peroxil. (SCHAUSS *et al.*, 2006a).

Por esta propriedade, nos últimos anos, o açaí tem sido utilizado no mercado nacional e internacional como alimento funcional.

Muitos dos benefícios fisiológicos dos compostos fenólicos são atribuídos à sua capacidade antioxidante direta, por meio da eliminação de espécies reativas ou indireta, ao aumentar a atividade ou expressão das enzimas antioxidantes endógenas (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2008) Neste estudo, foi analisada a influência dos frutos do açaí Juçara na prevenção do CCR.

Inicialmente, foi determinado o teor antocianinas totais da polpa do açaí. O valor médio de antocianina encontrado foi de 73,4 mg/100g. Este valor foi superior ao encontrado em polpas congeladas de açaí do Pará, por Kuskoski *et al.* (2006) (22,8mg/100g de açaí.). No entanto, estes valores são inferiores aos valores de  $252,9 \pm 10,1$  mg/100g, encontrados por Ribeiro *et al.* (2010) e 1.347 mg/100 g encontrados por Laderoza *et al.* (1992). Lichtenthaler *et al.* (2005) analisaram o conteúdo de antocianinas em 10 polpas de açaí de diferentes locais e encontraram variação dos teores entre 1,3 a 46,3 mg/100g.

Dentre os fatores que influenciam a quantidade de antocianina nos produtos comercializados de açaí está luz, temperaturas acima de 25°C e oxigênio (LOPES *et al.*, 2007). As polpas utilizadas nesse experimento foram armazenadas ao abrigo da luz e na temperatura adequada. As variações nas concentrações de antocianinas podem ser explicadas pela diferença em relação aos métodos de extração e quantificação. Além disso, o teor destas substâncias pode ser influenciado por fatores climáticos, como temperatura e iluminação (MACHEIX; FLEURIET, 1990).

O consumo de suco a partir da polpa de açaí Juçara pelos animais neste experimento foi em média de 35 mL por 12 horas. De acordo com dados da

Universidade Federal do Ceará, o consumo de água diário destes animais é de 10 a 12 mL/100 g de peso. Assim, o consumo de água/dia pelos animais deveria ser de 25 a 30 mL.

A ingestão média do suco de açaí Juçara no experimento foi maior que a média recomendada para a ingestão de água. Isto mostra que o suco foi palatável aos animais e, desta forma acredita-se que quantidades suficientes dos compostos fenólicos foram ingeridas.

A análise do número de FCA nos intestinos dos ratos mostrou que os ratos suplementados com açaí Juçara apresentaram menor número de FCA que os ratos não suplementados. Isto sugere que a ingestão do suco de açaí Juçara tenha influenciado o menor aparecimento de lesões pré-neoplásicas, por sua capacidade antioxidante, devido à presença de antocianinas.

Stoner *et al.*, (1991) em estudo de modelo experimental de câncer de esôfago em ratos, suplementaram a ração dos animais com compostos fenólicos. Os autores encontraram redução da tumorigênese, diminuição e estabilização do crescimento de células neoplásicas e atribuíram estes resultados a ação direta da suplementação com compostos fenólicos. De forma semelhante, a redução do número de células pré-neoplásicas após a ingestão suco de açaí Juçara do presente trabalho pode ser atribuída à ingestão de substâncias antioxidantes presentes no suco.

Os FCA são utilizados como biomarcadores para detecção de fatores de risco e de proteção, que influenciam a carcinogênese de cólon (CORPERT E PIERRE, 2005). Neste ensaio, catorze dias de suplementação com suco de açaí Juçara, houve redução total de FCA de 25,6%. Henriques (2009), que induziu o CCR com a substância DMH, porém com suplementação de ômega-3, outro composto antioxidante, obteve após trinta semanas de suplementação, 55,34% de redução total de focos de criptas aberrantes. Pode-se inferir que o suco preparado a partir da polpa de açaí Juçara amenizou a fase de promoção da carcinogênese do cólon.

O uso do açaí, *Euterpe oleracea* Martius, como quimioprotetor foi estudado por Fragoso *et al.* (2013). Os autores encontraram 41% de redução no número de FCA em ratos com carcinogênese de cólon induzida por DMH e tratados com açaí liofilizado, por 10 semanas. Este resultado reforça a importância do açaí Juçara na

redução de lesões pré-neoplásicas, visto que após 4 semanas de suplementação com suco houve redução considerável do número total de FCA.

Apesar dos estudos da literatura serem ainda escassos em relação ao papel de quimioprevenção do açaí Juçara (LIMA *et al.*, 2012; BARBOSA, 2014; CARDOSO *et al.*, 2015) nossos dados estão de acordo com os encontrados na literatura e indicam que o suco deste fruto pode, de fato, reduzir células aberrantes no intestino de ratos, provavelmente pela presença de compostos antioxidantes em seu extrato.

Os compostos fenólicos são responsáveis pela redução do estresse oxidativo, baseado nisso, o trabalho propôs ainda realizar a análise da expressão da SOD1, uma enzima que possui ação antioxidante, na catálise da dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ), em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) substâncias menos reativas no organismo. Em uma segunda etapa, a enzima catalase converte o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ). (VALKO *et al.*, 2007).

Em nosso estudo, o escore de expressão da SOD1 foi analisado em todas as amostras de tecido de intestino de ratos não induzidos à carcinogênese colorretal (grupo controle) e induzidos suplementados e não suplementados com açaí, sendo verificadas alterações na expressão apenas no grupo induzido à carcinogênese e suplementado com açaí Juçara. Estes resultados sugerem que o indutor de carcinogênese DMH, em condições fisiológicas de não suplementação e pela metodologia utilizada, não interfere na expressão da SOD1 na mucosa intestinal de ratos.

As análises dos escores também mostraram que a suplementação com o suco do açaí Juçara esteve relacionada de maneira significativa com o aumento do escore de expressão da SOD1 na mucosa colorretal com lesão pré-neoplásica dos animais investigados. Esse aumento do escore de expressão da SOD1 nos ratos suplementados pode estar relacionado a algum componente presente no açaí Juçara envolvido na transcrição da SOD1, uma vez que se observa o aumento da expressão da SOD1 com a suplementação com açaí Juçara.

Ao passo que ocorre o aumento do escore no grupo suplementado, observa-se também que, no mesmo grupo ocorre a redução do número de focos de criptas aberrantes. Com isso, pode-se supor que os radicais livres que lesionam o DNA,

podendo culminar em dano do epitélio do intestino e levar a formação de focos de criptas aberrantes foram combatidos, assim como Fragoso *et al.* (2013) concluiu com a redução de 41% de FCA com uso do açaí, *Euterpe oleracea* Martius, em ratos com carcinogênese de cólon induzida por DMH e tratados com açaí liofilizado, por 10 semanas.

A produção da SOD1 e das outras enzimas endógenas é induzida pela exposição às espécies reativas de oxigênio, por meio de um mecanismo regulado a nível transcricional (KENSLE; WAKABAYASHI; BISWAL, 2007). Em condições fisiológicas normais, proteína repressora Keap1(citoplasma) inibe a transcrição do fator Nrf2 (ITOH *et al.*, 2003). A Keap1 contém resíduos conservados de cisteína, os quais são muito importantes na manutenção do Nrf2 no citoplasma. O aumento na produção de EROS no organismo promove no citoplasma a dissociação do complexo Nrf2-Keap1, e o Nrf2 ativado é transportado para o núcleo (DAHL & MULCAHY, 2001; DE VRIES *et al.*, 2008). No núcleo das células o Nrf2 se liga a elementos de resposta a antioxidantes (ARE) na região promotora dos genes que transcrevem as enzimas antioxidantes endógenas (NGUYEN; SHERRATT; PICKETT, 2003). A ativação Nrf2-ARE induz a produção da superóxido dismutase, e todas as outras enzimas com papel antioxidante, como a catalase e a glutathione peroxidase (DRINGEN; PAWLOWSKI; HIRRLINGER, 2005; MCCORD & EDEAS, 2005). Após o reestabelecimento do equilíbrio da célula, o Nrf2 é dissociado do núcleo pelo Keap1, transportado para o citoplasma e degradado (SUN *et al.*, 2007).

Os polifenóis são os principais componentes fitoquímicos encontrados na polpa do açaí e sua atividade antioxidante é atribuída à capacidade de neutralização direta das espécies reativas pró-oxidantes (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2008). Além disso, dados experimentais indicam que polifenóis podem oferecer proteção indireta contra o estresse oxidativo por meio da ativação da transcrição gênica de enzimas do sistema de defesa antioxidante endógeno. Acredita-se que polifenóis podem influenciar a ativação de ARE, alterando a capacidade de Keap1 no sequestro de Nrf2. Assim, a Nrf2 é ativada e transportada para núcleo, onde se liga a ARE, e induz a produção da SOD (MASELLA *et al.*, 2005). Diante disto, o aumento na porcentagem de expressão de SOD1 nos grupos suplementados pode ser associado à ativação dos elementos de respostas antioxidantes (ARE) pelos antioxidantes presentes no suco do açaí Juçara.

Na literatura os resultados são ainda controversos, em relação à porcentagem de expressão da SOD1, sendo encontrados trabalhos comparativos ao presente estudo, entretanto com outros compostos fenólicos, que observaram aumento na expressão da SOD na suplementação; outros, no entanto, obtiveram expressão diminuída ou até mesmo inalterada com o uso de antioxidantes (BREINHOLT; LAURIDSEN; DRAGSTED, 1999; ALÍA *et al.*, 2003; AMARAL *et al.*, 2006, DE SOUZA *et al.* 2010).

A atividade da SOD foi avaliada em estudo com ratos suplementados com diferentes antioxidantes. Este trabalho demonstrou que a quercetina, encontrada principalmente na cebola, brócolis, maçã e cereja, aumentou a atividade de SOD, enquanto que a suplementação com genisteína, presente na soja, diminuiu. (BREINHOLT; LAURIDSEN; DRAGSTED, 1999). Este resultado sugere que o efeito gerado pelos antioxidantes depende da fonte e tipo dos compostos utilizados.

Alía *et al.* (2003) avaliaram o efeito de dieta rica em antioxidantes a partir da uva na atividade de enzimas antioxidantes no fígado de ratos e não foi encontrada diferença significativa na atividade de SOD entre o grupo tratado e o grupo controle. Entretanto Amaral *et al.* (2006), encontraram resultado adverso, com redução da expressão da SOD em ratos com indução de CCR e suplementados com inositol hexafostato em relação ao grupo controle. De Souza *et al.* (2010), encontraram resultado semelhante a Amaral *et al.*, (2006), com o uso de polpa de açaí. Neste caso, a análise foi realizada *in vivo* e a polpa de açaí diminuiu significativamente a atividade da superóxido dismutase em ratos com dieta hipercolesterolemizante.

Estes resultados indicam que a resposta à atividade dessas defesas depende do modelo utilizado no estudo, o grau de estresse oxidativo provocado, do tipo, quantidade e da fonte do antioxidante dietético, além do sistema biológico utilizado no estudo.

Da mesma forma que houve aumento no escore de expressão da SOD1, ou seja, número de células apresentando a enzima e a intensidade de expressão, no grupo suplementado, houve aumento da porcentagem da área de expressão da SOD1 neste grupo. Houve correlação entre o escore da expressão da SOD1, marcada por imuno-histoquímica e a mensuração por programa computacional das áreas correspondentes a imunomarcação. A seleção de dez campos aleatórios com arquivamento e contagem total de cada animal permitiu um tratamento estatístico

confiável para os resultados obtidos. Foi pertinente a escolha deste tipo de metodologia, com resultados satisfatórios em relação à suplementação do açaí Juçara na carcinogênese colorretal.

O uso do açaí Juçara pode ser um aliado na prevenção do câncer colorretal, visto a redução do número de lesões no epitélio do cólon e o possível auxílio no estímulo à produção de enzimas antioxidantes. O estudo abre perspectivas para o uso do açaí Juçara na suplementação dietética, na elaboração de produtos e medicamentos que favoreçam a prevenção e tratamento do câncer colorretal.

## **6. CONCLUSÃO**

1 – A suplementação com suco de açaí Juçara promoveu menor número de focos de criptas aberrantes na mucosa colorretal de ratos induzidos à carcinogênese

2 – A superóxido dismutase 1 foi expressa na mucosa colorretal de ratos induzidos ou não à carcinogênese e, tanto a análise semi-quantitativa quanto a quantitativa mostrou que a suplementação com o suco do açaí Juçara em ratos induzidos à carcinogênese resulta na maior expressão e percentual de ocupação da SOD1 em intestino grosso.

## 6. REFERÊNCIAS

ALÍIA, M. *et al.* Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. **Nutrition Research**, v. 23, n. 9, p. 1251-1267, 2003.

ALMEIDA, V. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**. V. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMARAL, E. G. A. S. *et al.* Study of superoxide dismutase's expression in the colon produced by azoxymethane and inositol hexaphosphate's paper, in mice. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, p. 27-31, 2006.

AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH FUND. **Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington. United States of America by RR Donnelley. 2007.

AUGUSTO, O. *et al.* EPR detection of glutathyl and hemoglobin-cysteinyl radicals during the interaction of peroxynitrite with human erythrocytes. **Biochemistry**, v. 41, n. 48, p. 14323-14328, 2002.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 141-155, 1997.

BARBACID, M. Ras genes. **Annual review of biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 779-827, 1987

BARBOSA, B. F. F. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade do fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis Martius*) em ratos Wistar**. 2014. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

BARROS, L. T. da C. **Efeitos do Orlistat na proliferação celular da mucosa colônica e na formação de focos de criptas aberrantes induzidos por Dimetilhidrazina em ratos**. 2006. . Dissertação- (Mestrado em Patologia). Universidade de São Paulo, São Paulo.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405-412, 1991.

BIRD, R. P. Observations and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**, Shannon v.37, p.147-151, 1987.

BORGES-OSÓRIO, M. R., ROBINSON, W. M. *Genética Humana*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 278 – 299.



BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia Alimentar para a População Brasileira: Promovendo a Alimentação Saudável**. Edição Especial. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição – Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 236p.

BREINHOLT, V.; LAURIDSEN, S. T.; DRAGSTED, L. O. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. **Xenobiotica**, v. 29, n. 12, p. 1227-1240, 1999.

BURT, R. W. *et al.* Risk and surveillance of individuals with heritable factors for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68, n. 5, p. 655, 1990.

CAMPOS, A.H.J.F.M. *et al.* Role of immunoexpression of nitric oxide synthases by Hodgkin and Reed-Sternberg cells on apoptosis deregulation and on clinical outcome of classical Hodgkin lymphoma. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 321, n. 1-2, p. 95-102, 2009.

CARDOSO, A. L. *et al.* Acute consumption of juçara juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 152-162, 2015.

CASSENS, R.G. Residual nitrite in cured meat. *Food Technology*, v. 51, n. 2, p. 53-55, 1997.

CERUTTI, P. A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European journal of clinical investigation**, v. 21, n. 1, p. 1-5, 1991.

CHENG, L.; LAI, M.. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 12, p. 2642-2649, 2003.

CHIU, B. *et al.* Dietary factors and risk of colon cancer in Shanghai, China. **Cancer Epidemiology, Biomarkers e prevention**. v. 12, p. 201-208, 2003.

COOKE, M.S. *et al.* Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB J**, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.

COOKE, D. *et al.* Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis—Relationship with tissue anthocyanin levels. **International journal of cancer**, v. 119, n. 9, p. 2213-2220, 2006.

CORPET, D. E.; PIERRE, F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1911-1922, 2005.

COSTA, E.A.D. *et al.* Produção de polpa e sementes dos frutos de *Euterpe edulis* – Uma alternativa de geração de renda e uso sustentável da mata Atlântica. Ubatuba. Instituto de Permacultura e Ecovilas da Mata Atlântica, São Paulo, 2006.

CROSS, C. E. *et al.* Oxygen radicals and human disease. **Annals of internal medicine**, v. 107, n. 4, p. 526-545, 1987.

DAHL, E. L.; MULCAHY, R. T. Cell-type specific differences in glutamate cysteine ligase transcriptional regulation demonstrate independent subunit control. **Toxicological Sciences**, v. 61, n. 2, p. 265-272, 2001.

DE BRITO, E. S. *et al.* Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.

DE CASTRO COTTI, G. C. *et al.* Genética do câncer colorretal. **Revista de Medicina**, v. 79, n. 2-4, p. 65-72, 2000.

DE SOUZA, M. O. *et al.* Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 7, p. 804-810, 2010.

DE VRIES, H. E. *et al.* Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 10, p. 1375-1383, 2008.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. S1, p. S128-S138, 2008.

DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P.G.; HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brain cells. **Journal of neuroscience research**, v. 79, n. 1-2, p. 157-165, 2005.

DRAY, X *et al.* **Influence of dietary factors on colorectal cancer survival.** Gut. Paris, v. 52, p. 868-873, 2003.

FEARON, Eric R.; VOGELSTEIN, Bert. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-767, 1990.

FENOGLIO-PREISER, C. M.; NOFFSINGER, A. Review article: Aberrant crypt foci: A Review. **Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 6, p. 632-642, 1999.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo, v. 43, n. 1, 1997.

FRAGOSO, M. F. *et al.* Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food and chemical toxicology**, v. 58, p. 68-76, 2013.

FORTES, R. C. Hábitos Dietéticos de Pacientes com Câncer Colorretal em Fase Pós-operatória. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 277-289, 2007.

GARÓFOLO, A. *et al.* Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Rev. Nutr**, v. 17, n. 4, p. 491-505, 2004.

GARTNER, L. **Tratado de histologia**. Elsevier Brasil, 2011.

GLINGHAMMAR, B. *et al.* Shift from a dairy product-rich to a dairy product-free diet: Influence on cytotoxicity and genotoxicity of fecal water – potential risk factors for colon cancer. **Am J Clin Nutr**, Estados Unidos, v. 66, p. 1277-1282, 1997.

GLOVER, B. J.; MARTIN, C. Anthocyanins. **Current Biology**, Cambridge, v. 22, n. 5, p. R147-R150, 2012.

GRODEN, J. *et al.* Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. **Cell**, v. 66, n. 3, p. 589-600, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine. 1985.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **The FASEB Journal**, v. 1, n. 5, p. 358-364, 1987.

HAMILTON S.R., AALTONEN L.A. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC Press:Lyon 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Oxford university press, 1999.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

HARSHMAN, M.R.; ALDOORI, W. Diet and colorectal cancer. Canadá. **Canadian Family Physician**. v. 57, p. 1913-1920, 2007.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 1, n. 1, p. 163-187, 2010.

HEDRICK, L. *et al.* The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. **Genes & development**, v. 8, n. 10, p. 1174-1183, 1994.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)-A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochem Lett**, v. 4, n. 1, p. 10-21, 2011.

HENRIQUES, V. T. *et al.* Omega-3 fatty acids reduce the development of preneoplastic lesions. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 2, p. 237-244, 2009.

HERNEGGER, G. S.; MOORE, H. G.; GUILLEM, J. G. Attenuated familial adenomatous polyposis: an evolving and poorly understood entity. **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 45, n. 1, p. 127-34; discussion 134-6, 2002.

HOGAN, S. *et al.* Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208-214, 2010.

HUR, K.; *et al.* Overexpression of cyclin D1 and cyclin E in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced rat colon carcinogenesis. **Journal Veterinary Science**, v.1, n.2, p121-126, 2000.

HYER, W. Polyposis syndromes: pediatric implications. **Gastrointestinal endoscopy clinics of North America**, v. 11, n. 4, p. 659-82, vi-vii, 2001.

IARC, International Agency for Research on cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=colorectal](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal)>. Acesso em: 10 out. 2015

IARC, International Agency for Research on cancer. IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat. 2015. Disponível em: <[http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240\\_E.pdf](http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_E.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2016.

INÁCIO, M. R. C.; DE LIMA, K. M. G.; LOPES, V. G.; PESSOA, J. D. C.; DE ALMEIDA TEIXEIRA, G. H. Total anthocyanin content determination in intact acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3-4, p. 1160-1164, 2013.

INCA. Instituto nacional do câncer. 27 de novembro-Dia nacional de combate ao câncer. 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em: 10 out. 2015.

INCA. Instituto nacional do câncer. INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014. 2013. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca\\_ministerio\\_saude\\_apresentam\\_estimativas\\_cancer\\_2014](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014)>. Acesso em: 10 out. 2015.

ITOH, K. *et al.* Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. **Genes to Cells**, v. 8, n. 4, p. 379-391, 2003.

JANČÍK, S. *et al.* Clinical relevance of KRAS in human cancers. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.

JACOBS, E. T. *et al.* Fiber, sex, and colorectal adenoma: results of a pooled analysis. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 2, p. 343-349, 2006.

JEMAL, A. *et al.* Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011

JORDE, L. B. *et al.* Genética Médica. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 197 – 221. 2000

KANG, S.Y. *et al.* Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc Min mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. **Cancer letters**, v. 194, n. 1, p. 13-19, 2003.

KANG, J. *et al.* Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 610-617, 2010.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 47, p. 89-116, 2007.

KNUDSEN, A. L.; BISGAARD, M. L.; BÜLOW, S. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): a review of the literature. **Familial cancer**, v. 2, n. 1, p. 43-55, 2003.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

LADEROZA, M. *et al.* Anthocyanins from fruits of acai (*Euterpe oleracea*, Mart) and jucara (*Euterpe edulis*, Mart). **Tropical science**, v. 32, n. 1, p. 41-46, 1992.

LESER, S.M; SOARES, E.A. Aspectos nutricionais e atividade física na prevenção do câncer colorretal. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação Nutrição**. São Paulo, v. 21, p. 121-145, 2001.

LICHTENTHÄLER, Ramona *et al.* Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart.(Acai) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 53-64, 2005.

LIMA, L.S.H.; FRANCO, E.T.H.; SCHUMACHER, M.V. Crescimento de mudas de *Euterpe edulis* Martius em resposta a diferentes doses de fósforo. **Ciência Florestal**, v.18, n.4, p.461-70, 2008.

LIMA, C.P. *et al.* . Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius). **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 321-326, 2012.

LOPES, T. J. *et al.* Antocianinas: Uma Breve Revisão das Características estruturais e da estabilidade. **R. Bras. Agrociência**, v.13, n.3, p. 291-297, jul-set, 2007.

LOSI, L. *et al.* K-ras and p53 Mutations in Human Colorectal Aberrant Crypt Foci. **The Journal of pathology**, v. 178, n. 3, p. 259-263, 1996.

LUZ, T.C. Avaliação do efeito da antocianina presente no açaí-juçara (*Euterpe edulis* mart.) no modelo experimental de câncer de cólon em ratos. 2014. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Nutrição). Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.

LYNCH, H. T. *et al.* Hereditary factors in cancer: study of two large Midwestern kindreds. **Archives of internal medicine**, v. 117, n. 2, p. 206-212, 1966.

LYNCH, H. T.; SMYRK, T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): an updated review. **Cancer**, v. 78, n. 6, p. 1149-1167, 1996.

MACHEIX, Jean-Jacques; FLEURIET, Annie. **Fruit phenolics**. CRC press, 1990.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANGO, C.; MEDEIROS, M. L.; MALUF, F. C. Pólipos e polipose juvenil: estudo epidemiológico e histológico de 45 casos. **Rev. bras. colo-proctol**, v. 14, n. 2, p. 92-5, 1994.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, 3rd JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 17, n. 2438.26, 2003.

MASELLA, R. *et al.* Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577-586, 2005.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MCCORD, J.M.; EDEAS, M. A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, n. 4, p. 139-142, 2005.

MEDRADO-FARIA, M. A.; ALMEIDA, J.W.R.; ZANETTA, D. M. T. Gastric and colorectal cancer mortality in an urban and industrialized area of Brazil. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 56, n. 2, p. 47-52, 2001.

MENEZES, E.M.S.; TORRES, A.T.; SRUR, A.U.S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta Amazônica**, v.38, n.2, p.311-6, 2008.

MICHELS, K. B. *et al.* Fiber intake and incidence of colorectal cancer among 76,947 women and 47,279 men. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 4, p. 842-849, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Incidência de Câncer no Brasil. Internet. 2007. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/>>. Acesso em: 11 out. 2015.

MIYAMOTO, S. *et al.* Protective effect of phytic acid hydrolysis products on iron-induced lipid peroxidation of liposomal membranes. **Lipids**, v. 35, n. 12, p. 1411-1414, 2000.

MOISIO, A.L.; JÄRVINEN, H.; PELTOMÄKI, P. Genetic and clinical characterisation of familial adenomatous polyposis: a population based study. **Gut**, v. 50, n. 6, p. 845-850, 2002.

MORRISON, Wallace B. Inflammation and cancer: a comparative view. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 1, p. 18-31, 2012.

MULERIS, M. *et al.* Consistent deficiencies of chromosome 18 and of the short arm of chromosome 17 in eleven cases of human large bowel cancer: a possible recessive determinism. In: **Annales de genetique**. 1984. p. 206-213.

NEVES, F. J.; KOIFMAN, R. J.; MATTOS, I. E. Mortalidade por câncer de cólon e reto e consumo alimentar em capitais brasileiras selecionadas. *Rev Bras Epidemiol.*, v. 9, n. 1, p. 112-120, 2006.

NGUYEN, T.; SHERRATT, P.J.; PICKETT, C.B. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 43, n. 1, p. 233-260, 2003.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver Cu, Zn-SOD in mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38388-38393, 2001.

OWEN, R.W.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Phytate, reactive oxygen species and colorectal cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 7, n. 2, p. S41-54, 1998.

PACHECO-PALENCIA, L. A. *et al.* Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3593-3600, 2008.

PERŠE, M.; CERAR, A. Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. **BioMed Research International**, v. 2011, 2010.

PITOT, H.C. Adventures in hepatocarcinogenesis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 2, p. 1-29, 2007.

POLI, A. *et al.* Non-pharmacological control of plasma cholesterol levels. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 18, n. 2, p. S1-S16, 2008.

REIS, A., KAGEYAMA, P.Y. Seed dispersal of palmito ( *Euterpe edulis* Martius-Palmae). **Sellowia**, n. 49/52, p. 60-92, 2000.

RIBEIRO, M. L. *et al.* Avaliação do Dano Oxidativo ao DNA de Células Normais e Neoplásicas da Mucosa Cólicas de Doenças com Câncer de cólon retal. **Rev bras Coloproct.** V.27, n. 4 Out-Dez, 2007.

RIBEIRO, J. C., *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp ( *Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat.Res.* **695**, 22-8. 2010.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n. 3, p. 559S-569S, 2003.

RODRIGUES, M. A. M., *et al.* Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short – and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, São Paulo, v.35, n.3, p.351-355, 2002.

ROGEZ, H. Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação. Belém: EDUFPA. 313p. 2000.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. **Membrane lipid oxidation**, v. 2, p. 151-170, 1991.

ROYNETTE, C. E.; CALDER, P. L.; DUPERTUIS, Y. M.; PICHARD, C. n-3 Polynsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**, Bethesda, v.23, p.139-151, jul. 2004.

RUSSO, G. L. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 533-544, 2007.

SCHAUSS, A. G., *et al.* Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart.(acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8604-8610, 2006a.

SCHAUSS, A. G., *et al.* Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart.(Acai). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598-8603, 2006b.

SCHIRMANN, G. S. Composição em ácidos graxos do açaí ( *Euterpe edulis* ) de diversas regiões de Santa Catarina. 80p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SCOTT-STUMP, Sylvia; MAHAN, L.Kathleen. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 9a.ed. São Paulo: Roca. 2002.



SEIFRIED, H. E. *et al.* A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567-579, 2007.

SHILS, M., *et al.* **Tratamento de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9ª ed. São Paulo: Manole. 2002.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. In: **EJB Reviews 1993**. Springer Berlin Heidelberg, 1994. p. 101-107.

SILVA, M.G.C.P.C.; BARRETTO, W. S.; SERÔDIO, M. H. Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açaí. **Ilhéus: Centro de Pesquisa do Cacau, Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento**, 2004.

SINGH, P. N.; FRASER, G. E. Dietary Risk Factors for Colon Cancer in a Low-risk Population. **Am J Epidemiol**, Estados Unidos, v. 148, n. 8, p. 761-74, 1998.

SOINI, Y. *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. **British journal of cancer**, v. 83, n. 7, p. 880, 2000.

SPORN, M.B.; LIBY, K.T. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2, n. 10, p. 518-525, 2005.

STONER, G. D. *et al.* Inhibitory effects of phenetyl isothiocyanate on N-nitrosobenzylmethylamine carcinogenesis in the rat esophagus. **Cancer Research**, v. 51, n. 8, p. 2063-2068, 1991.

SUN, Z. *et al.* Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 18, p. 6334-6349, 2007.

SZMITKO, Paul E.; VERMA, Subodh. Antiatherogenic potential of red wine: clinician update. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 5, p. H2023-H2030, 2005.

SZYF, M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 100, n. 1, p. 7-23, 2007.

TAKAHASHI, M.; WAKABAYASHI, K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer science**, v. 95, n. 6, p. 475-480, 2004.

THORSON, A. G.; KNEZETIC, J. A.; LYNCH, H. T. A century of progress in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). **Diseases of the colon & rectum**, v. 42, n. 1, p. 1-9, 1999.

TSUDA, T. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 56, n.1, p. 159-170, 2012.

TUDEK, B.; SPEINA, E. Oxidatively damaged DNA and its repair in colon carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 736, n. 1, p. 82-92, 2012.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VIGIL, D. *et al.* Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 12, p. 842-857, 2010.

VOGELSTEIN, B. *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 9, p. 525-532, 1988.

VOLP, A. C. P., *et al.* Flavonóides Antocianinas: característica e propriedade na nutrição e saúde. **Ver. Bras. Nutr. Clin.** V. 23, n.2, p 141-149, 2008.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A. M. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3778S-3784S, 2003.

WALLACE, H. M.; CASLAKE, R. Polyamines and colon cancer. **European Journal of gastroenterology and Hepatology**, v.13, p.1033-1039, 2001.

WANG, S.Y.; JIAO, H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5677-5684, 2000.

WANG, L. S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 269, n. 2, p. 281-290, 2008.

WEIJL, N. I.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapyinduced toxicity. **Cancer treatment reviews**, v. 23, n. 4, p. 209-240, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **The World health report 2003**: Shaping the future. Geneva: WHO 2003.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. **Food Research International**, v. 44, n. 10, p. 3135-3148, 2011.

YU, H.J.A, *et al.* Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: preventive management. **Cancer treatment reviews**, v. 29, n. 6, p. 461-470, 2003.

## 7. ANEXO

				
<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA</p>				
<h1>CERTIFICADO</h1>				
<p>Certificamos que o Protocolo nº. 043/2013, relativo ao projeto de pesquisa intitulado <b>"Avaliação do efeito antioxidante do Açai-Juçara (Euterpe edulis Mart.) sobre modelo experimental de câncer de colon em ratos."</b>, que tem como responsável o (a) docente <b>Leonardo Oliveira Trivilin</b>, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado.</p>				
 Prof. Dr. Douglas Severina CRMV-48 0680/Medicus 01546810 Presidente CEUA-UFES	Vitória (ES), 18 de outubro de 2013.			
<table border="1"><tr><td>RECEBEMOS</td></tr><tr><td>21/10/13</td></tr><tr><td></td></tr></table>		RECEBEMOS	21/10/13	
RECEBEMOS				
21/10/13				
				